

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C07H 1/00		A2	(11) International Publication Number: WO 99/38874 (43) International Publication Date: 5 August 1999 (05.08.99)		
(21) International Application Number: PCT/US99/01137		(81) Designated States: AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).			
(22) International Filing Date: 19 January 1999 (19.01.99)					
(30) Priority Data: 09/016,531 30 January 1998 (30.01.98) US		Published <i>Without international search report and to be republished upon receipt of that report.</i>			
(71) Applicant: THE PERKIN-ELMER CORPORATION [US/US]; 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).					
(72) Inventors: SLATER, Gary; 109 Hopewell Avenue, Ottawa, Ontario K1S 2Y9 (CA). EFCAVITCH, J., William; 418 East 16th Avenue #A, San Mateo, CA 94402 (US). DROUIN, Guy; 213 du Mont-Luc, Gatineau, Québec J8V 2B5 (CA). MAYER, Pascal; 14, chemin du Ney, F-01200 Eloise (FR). ROUSSEAU, Jean; Appartement 100, 9, rue Halmimand, Québec, Québec G1R 4N3 (CA). ZHOU, Hong, Yan; 1337 Highgate Road, Ottawa, Ontario K2C 2Y5 (CA). CHIESA, Claudia; 1011 Palm Avenue, Redwood City, CA 94061 (US). RUHFEL, Robert; Apartment A, 445 Scott Street, San Francisco, CA 94117 (US). O'NEILL, Roger; 3180 Melendy Drive, San Carlos, CA 94070 (US).					
(74) Agent: GROSSMAN, Paul, D.; The Perkin-Elmer Corporation, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).					
(54) Title: ELECTROPHORETIC NUCLEIC ACID PURIFICATION METHOD					
(57) Abstract					
<p>An electrophoretic method for purifying a nucleic acid sample is disclosed. The method generally comprises the steps of (1) providing a nucleic acid sample comprising a desired nucleic acid and one more contaminants, (2) providing an electrophoresis matrix having a loading well and a recovery well formed therein, (3) placing the nucleic acid sample into the loading well, (4) performing a first electrophoresis comprising electrophoresing the nucleic acid sample for a first time effective to transport the desired nucleic acid out of the loading well and into the electrophoresis matrix; and (5) performing a second electrophoresis comprising electrophoresing the nucleic acid sample for a second time effective to transport the desired nucleic acid out of the electrophoresis matrix and into the recovery well. According to the method, the first and second electrophoresis steps are effective to substantially reduce the concentration of contaminants relative to the concentration of desired nucleic acid in the nucleic acid sample, thereby producing a purified nucleic acid. In the method, the loading and recovery wells may be the same or different, and the electric fields may be DC or alternating. Also disclosed is a preparative electrophoresis method employing an alternating electrical field.</p>					

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-502020

(P2002-502020A)

(43)公表日 平成14年1月22日 (2002.1.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコト [*] (参考)
G 0 1 N 27/447		B 0 1 D 57/02	
B 0 1 D 57/02		B 0 3 C 5/00	Z
B 0 3 C 5/00		C 0 7 H 21/02	
C 0 7 H 21/02		21/04	A
21/04		G 0 1 N 27/26	3 1 5 H
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2000-529341(P2000-529341)
(36) (22)出願日	平成11年1月19日(1999.1.19)
(85)翻訳文提出日	平成12年7月25日(2000.7.25)
(36)国際出願番号	PCT/US99/01137
(37)国際公開番号	WO99/38874
(37)国際公開日	平成11年8月5日(1999.8.5)
(31)優先権主張番号	09/016, 531
(32)優先日	平成10年1月30日(1998.1.30)
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)指定国	E P (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), AU, CA, JP

(71)出願人	ピーイー コーポレイション (エヌワ イ) アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94404 フォスター シティ, リンカーン センター ドライブ 850
(71)出願人	ザ ユニバーシティ オブ オタワ カナダ国 ケ-1エヌ 6エヌ5 オンタ リオ, オタワ, カンバーランド スト リート 550
(74)代理人	弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 電気泳動による核酸精製法

(57)【要約】

核酸サンプルを精製するための電気泳動による方法が、開示される。この方法は一般的に以下の工程を包含する：（1）所望の核酸および1つ以上の夾雑物を含む核酸サンプルを提供する工程、（2）電気泳動マトリクスにおいて形成される、ローディングウェルおよび回収ウェルを有する電気泳動マトリクスを提供する工程、（3）この核酸サンプルをローディングウェル中に置く工程、（4）このローディングウェルから出てこの電気泳動マトリクス中へとこの所望の核酸を移動させるために有効な第1の時間の間、この核酸サンプルを電気泳動する工程を包含する、第1の電気泳動を実行する、工程；および（5）この電気泳動マトリクスから出てこの回収ウェル中へとこの所望の核酸を移動させるために有効な第2の時間の間、この核酸サンプルを電気泳動する工程を包含する、第2の電気泳動を実行する、工程。この方法に従って、この第1のおよび第2の電気泳動工程が、核酸サンプル中の所望の核酸の濃度と比較して、夾雑物の濃度を実質的に減少させるために有効であり、その結果、精製された核酸を生成する。この方法におい

て、このローディングウェルおよび回収ウェルは、同じウェルである得るか、または異なるウェルであり得、そしてこの電場は、DCまたは交流であり得る。交流電場を使用する、分取電気泳動法もまた、開示される。

【特許請求の範囲】

- 【請求項1】 核酸サンプルを精製する方法であって、以下の工程：
所望の核酸および1つ以上の夾雜物を含む核酸サンプルを提供する工程；
電気泳動マトリクスにおいて形成される、ローディングウェルおよび回収ウェルを有する電気泳動マトリクスを提供する工程；
該核酸サンプルを該ローディングウェル中に置く工程；
該ローディングウェルから出て該電気泳動マトリクス中へと該所望の核酸を移動させるために有効な第1の時間の間、該核酸サンプルを電気泳動する工程を包含する、第1の電気泳動を実行する、工程；および
該電気泳動マトリクスから出て該回収ウェル中へと該所望の核酸を移動させるために有効な第2の時間の間、該核酸サンプルを電気泳動する工程を包含する、第2の電気泳動を実行する工程であって、
ここで、該第1の電気泳動および該第2の電気泳動が、所望の核酸の濃度と比較して、夾雜物の濃度を実質的に減少させるために有効であり、その結果、精製された核酸を生成する、工程、
を包含する、方法。
- 【請求項2】 前記ローディングウェルおよび前記回収ウェルが、空間的に重なるウェルである、請求項1に記載の方法。
- 【請求項3】 前記ローディングウェルおよび前記回収ウェルが、空間的に別個のウェルである、請求項1に記載の方法。
- 【請求項4】 前記マトリクスが、張出し部分およびウェルーマトリクス界面部分を含み、前記所望の核酸が該マトリクスの該張出し部分に進入することを実質的に妨げるように、該マトリクスが前記第1の電気泳動の間に該ウェルーマトリクス界面部分中に該所望の核酸を捕捉するために効果的である、請求項2に記載の方法。
- 【請求項5】 前記第1の時間が、前記第2の時間より短い、請求項4に記載の方法。
- 【請求項6】 前記第1の時間が20分以上であり、そして前記第2の時間が30秒以下である、請求項5に記載の方法。

【請求項 7】 前記第2の電気泳動がLITAC電場を使用する、請求項4に記載の方法。

【請求項 8】 前記第1の電気泳動が、ローディングウェルから出て電気泳動マトリクスを通り、そして夾雑物希釈レザーバ中へと前記夾雑物の一部を移動させるために十分であり、該レザーバが、該レザーバに進入する該夾雑物を実質的に希釈するために十分な容量の緩衝液を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 9】 前記第1の電気泳動がDC電場を使用し、そして前記第2の電気泳動がLITAC電場を使用する、請求項2に記載の方法。

【請求項 10】 前記LITAC電場が、大きさ E_f を有する順方向電場、および大きさ E_r を有する逆方向電場を含み、ここで、 E_f/E_r 比が2よりも大きい、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】 前記LITAC電場が、大きさ E_f を有する順方向電場、および大きさ E_r を有する逆方向電場を含み、ここで、 E_f/E_r 比が約2.4である、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】 前記第1の電気泳動がDC電場を使用し、そして前記第2の電気泳動がLITAC電場を使用する、請求項3に記載の方法。

【請求項 13】 前記LITAC電場が、大きさ E_f を有する順方向電場、および大きさ E_r を有する逆方向電場を含み、ここで、 E_f/E_r 比が2よりも大きい、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】 前記LITAC電場が、大きさ E_f を有する順方向電場、および大きさ E_r を有する逆方向電場を含み、ここで、 E_f/E_r 比が約2.4である、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】 前記第1の電気泳動が、前記所望の核酸を第1の方向に電気泳動する工程を包含し、そして前記第2の電気泳動が、該所望の核酸を該第1の方向とは異なる第2の方向に電気泳動する工程を包含する、請求項3に記載の方法。

【請求項 16】 前記第1の電気泳動がDC電場を使用し、そして前記第2の電気泳動がLITAC電場を使用する、請求項15に記載の方法。

【請求項 17】 前記LITAC電場が、大きさ E_f を有する順方向電場、

および大きさ E_r を有する逆方向電場を含み、ここで、 E_f/E_r 比が2よりも大きい、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 前記LITAC電場が、大きさ E_f を有する順方向電場、および大きさ E_r を有する逆方向電場を含み、ここで、 E_f/E_r 比が約2.4である、請求項17に記載の方法。

【請求項19】 核酸サンプルを精製する方法であって、以下の工程：
所望の核酸および1つ以上の夾雜物を含む核酸サンプルを提供する工程；
電気泳動マトリクスにおいて形成されるローディング／回収ウェルを有する電気泳動マトリクスを提供する工程であって；

ここで、該電気泳動マトリクスが、張出し部分およびウェルーマトリクス界面部分を含み、該所望の核酸が該マトリクスの該張出し部分に進入することを妨げるように、該マトリクスが該ウェルーマトリクス界面部分中に該所望の核酸を捕捉するために効果的である、工程；

該核酸サンプルを該ローディング／回収ウェル中に置く工程；
該ローディング／回収ウェルから出て該電気泳動マトリクスの該ウェルーマトリクス界面部分中へと該所望の核酸を移動させるために有効な第1の時間の間、該核酸サンプルを電気泳動する工程を包含する、第1の電気泳動を実行する、工程であって；

ここで、該第1の電気泳動が、所望の核酸の濃度と比較して、夾雜物の濃度を実質的に減少させるために有効であり、その結果、精製された核酸を生成する、工程；および

該精製された核酸を、該ローディング／回収ウェルから取り出す工程、を包含する、方法。

【請求項20】 電気泳動マトリクス中にある核酸サンプルの電気泳動のための方法であって、順方向電場 E_f および逆方向電場 E_r を含むLITAC電場に該核酸サンプルを供する工程を包含する、方法。

【請求項21】 E_f/E_r 比が2～3の範囲にわたる、請求項20に記載の方法。

【請求項22】 E_f/E_r が約2.4である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 電気泳動マトリクス中にある核酸サンプルの電気泳動のための方法であって、順方向電場 E_F および逆方向電場 E_R を含むZIE電場に対して該核酸サンプルを供する工程を包含する、方法。

【請求項24】 E_F/E_R 比が2～3の範囲にわたる、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 E_F/E_R が約2.4である、請求項24に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****(発明の分野)**

本発明は、電気泳動の分野に関する。より詳細には、本発明は、核酸の精製のために有用な電気泳動法および装置に関する。

【0002】**(背景)**

核酸構造の分析は、多くの現代生物学、生物工学、および医学の焦点になってきた。PCR、制限断片長多型分析、およびDNA配列決定のような現代の核酸分析技術は、疾患の診断、生物の同定、および進化の関連性の追跡を含む、種々の適用について有用な情報を提供する。任意の核酸分析法において必要な予備工程は、これらの技術において使用される酵素を妨げ得る夾雑物（例えば、PCRおよびDNA配列決定法において使用されるポリメラーゼ酵素を不活化し得る夾雑物）を含まない核酸の調製である。

【0003】

広範な種々の核酸精製技術は、ある範囲の異なった物理的および化学的原理に基づいて利用可能である。最も一般的な核酸精製法としては、有機性／水性の液体－液体抽出、固相吸着、沈殿、密度勾配遠心分離、および分取電気泳動（preparative electrophoresis）が挙げられる。電気泳動法は、高純度および高分子量を有する核酸が得られることから、特に魅力的である。

【0004】

しかし、従来の分取電気泳動法は、これらの実際的な有用性を、特に高処理能力適用の状況において限定する、重大な短所を有する。従来の分取電気泳動法の、特に問題のある局面は、精製された核酸を電気泳動媒体（例えば、電気泳動ゲル）から取り出す問題である。サンプル取り出しプロセスの1つのクラスにおいて、精製された核酸は、手動で、電気泳動ゲルから切り取られる。核酸およびゲル物質がサンプルのバンドの切り出し後に分離されなければならず、この手順は有意な手動の介入を必要とし、そして、所望のサンプルのバンドを位置付けるた

めに、精製された核酸を切り出しの前に可視化しなければならないので、これらのサンプル切り出し法は不利である。サンプル取り出し技術の第2のクラスにおいて、精製されたサンプルは、電気泳動ゲルからゲルを含まない緩衝液へ溶出される。しかし、このような溶出法は、複数の画分を回収し、精製されたサンプルのバンドを可視化し、そして／または所望の核酸の溶出特性が公知であることを必要とする。

【0005】

(要旨)

本発明は、核酸の精製のために有用な、あるクラスの新規の分取電気泳動法の発見に関する。この方法は、酵素を用いる処理（例えば、サンガー型配列決定、オリゴヌクレオチド連結アッセイ、およびPCR）の前の、核酸サンプルの調製について、特に有用である。

【0006】

第1の局面において、本発明は、以下の工程：（1）所望の核酸および1つ以上の夾雑物を含む核酸サンプルを提供する工程、（2）電気泳動マトリクスにおいて形成されるローディングウェルおよび回収ウェルを有する電気泳動マトリクスを提供し、核酸サンプルをローディングウェル中に置く工程、（3）このローディングウェルから出てこの電気泳動マトリクス中へとこの所望の核酸を移動させるために有効な第1の時間の間、この核酸サンプルを電気泳動する工程を包含する、第1の電気泳動を実行する工程、（4）この電気泳動マトリクスから出てこの回収ウェル中へとこの所望の核酸を移動させるために有効な第2の時間の間、この核酸サンプルを電気泳動する工程を包含する、第2の電気泳動を実行する工程、（5）ここで、この第1の電気泳動およびこの第2の電気泳動が、所望の核酸の濃度と比較して、この夾雫物の濃度を実質的に減少させるために効果的であり、その結果、精製された核酸を生成する工程、を包含する、核酸サンプルを精製する方法を包含する。この方法において、上記ローディングウェルおよび上記回収ウェルは、同じウェルであり得るか、または異なるウェルであり得る。

【0007】

本発明の「捕捉様式」として本明細書で言及される、本発明のこの第1の局面

における、第1の好ましい実施態様において、上記ローディングウェルおよび上記回収ウェルは、空間的に、重なるウェルであり、そしてこの電気泳動マトリクスは、張出し部分およびウェルーマトリクス界面部分を含み、そしてこのマトリクスは、上記所望の核酸がこのマトリクスのこの張出し部分に進入することを実質的に妨げるように、このウェルーマトリクス界面部分中にこの所望の核酸を捕捉するために効果的である。

【0008】

本発明の「夾雜物希釈様式」として本明細書で言及される、第1の局面における、第2の好ましい実施態様において、上記ローディングウェルおよび上記回収ウェルは、空間的に、重なるウェルであり、そして上記第1の電気泳動は、ローディングウェルから出て電気泳動マトリクスを通り、そして夾雜物希釈レザーバ中へと上記夾雜物の一部を移動させるために十分であり、このレザーバは、このレザーバ中に進入するこの夾雜物を実質的に希釈するために十分な容量の緩衝液を含む。

【0009】

「LITAC逆方向電場（reverse field）様式」として本明細書で言及される、本発明の第1の局面における、第3の好ましい実施態様において、上記ローディングウェルおよび上記回収ウェルは、空間的に、重なるウェルであり、上記第1の電気泳動はDC電場を使用し、そして上記第2の電気泳動はLITAC電場を使用する。

【0010】

本発明の第1の局面における、第4の好ましい実施態様において、上記ローディングウェルおよび上記回収ウェルは、空間的に別個であり、そして上記第1の電気泳動はDC電場を使用し、そして上記第2の電気泳動はLITAC電場を使用する。

【0011】

本発明の第1の局面における、第5の好ましい実施態様において、上記ローディングウェルおよび上記回収ウェルは、空間的に別個であり、そして上記第1の電気泳動は、上記所望の核酸を第1の方向に電気泳動する工程を包含し、そして

上記第2の電気泳動は、この所望の核酸をこの第1の方向とは異なる第2の方向に電気泳動する工程を包含する。

【0012】

第2の局面において、本発明は、順方向電場 E_F および逆方向電場 E_R を含むLITAC電場に対して核酸サンプルを供する工程を包含する、電気泳動マトリクス中に置かれた核酸サンプルの電気泳動のための方法からなる。

【0013】

第3の局面において、本発明は、順方向電場 E_F および逆方向電場 E_R を含むZIVE電場に対して核酸サンプルを供する工程を包含する、電気泳動マトリクス中に置かれた核酸サンプルの電気泳動のための方法を包含する。

【0014】

上記に記載した発明の種々の局面および／または実施態様は、公知の電気泳動による精製法を超える、1つ以上の、以下の重要な利点を達成する：（1）本発明の方法を使用すると、電気泳動による分離に続いて、電気泳動ゲルからサンプルのバンドを取り出す必要がない——代わりに、精製されたサンプルは、ゲルを含まない回収ウェルに置かれ、そしてそれに続く酵素処理に適切な緩衝液中に溶解され、それによって、精製後のサンプル回収の自動化を非常に容易にする；（2）本発明の方法を使用すると、電気泳動後の溶出プロセスから得られる複数の画分を回収する必要がない——代わりに、精製されたサンプルは、ゲルを含まない回収ウェルに置かれ、そしてそれに続く酵素処理に適切な緩衝液中に溶解され、それによってサンプルの希釈量を減少させ、複数の画分を回収する必要を無くし、そして所望の核酸の移動挙動を演繹的に理解する必要を無くす；（3）本発明の方法を使用すると、所望の核酸の回収を果たすために、電気泳動による分離に続いて、この所望の核酸を可視化する必要がない——代わりに、電気泳動に続いて、精製されたサンプルは、ゲルを含まない回収ウェルに置かれる；（4）本発明の方法を使用すると、電気泳動マトリクスを、精製された核酸から分離する必要がない；および（5）本発明の方法を使用すると、核酸は、精製された核酸を濃縮するために遠心分離またはエタノール沈殿を実施する必要なしに、1回の工程で、効率的なPCR增幅を可能にする十分な純度まで精製される。

【0015】

本発明のこれらおよび他の特徴および利点は、以下の説明、図面、および添付の特許請求の範囲を参照して、より理解されるようになる。

【0016】**(好ましい実施態様の詳細な説明)**

ここで、本発明の好ましい実施態様に対して詳細に参照がなされ、これらの例は、添付される図面において例示される。本発明は好ましい実施態様に関連して記載されるが、好ましい実施態様は、これらの実施態様に本発明を限定することを意図しないことが理解される。逆に、本発明は、添付された特許請求の範囲によって定義されるように本発明中に含まれ得る、代替物、改変物、および等価物(equivalent)を包含することが意図される。

【0017】

一般的に、本発明の方法は、2つの画分：臨界サイズM*よりも小さな核酸分子および精製された核酸の酵素処理を妨げる夾雜物を含む第1の画分、ならびに本明細書中で「所望の核酸」として言及される分子のような、M*よりも大きな核酸分子を含む第2の画分、への核酸サンプルの分離をもたらす。

【0018】

本発明の方法は、一般的に、以下の6つの方法の工程を包含する：(1) 所望の核酸および1つ以上の夾雜物を含む核酸サンプルを提供する工程；(2) 電気泳動マトリクスにおいて形成されるローディングウェルおよび回収ウェルを有する電気泳動マトリクスを提供する工程であって、ここで、このローディングウェルおよび回収ウェルは、同じウェルであり得るか、または異なるウェルであり得る、工程；(3) この核酸サンプルを、ローディングウェル中に置く工程；(4) 第1の電気泳動を実行する工程であって、ここでこの核酸サンプルが、この所望の核酸を、このローディングウェルから出して移動させるために効果的な第1の時間の間電気泳動される、工程；(5) 第2の電気泳動を実行する工程であって、ここでこの核酸サンプルが、この所望の核酸を、この回収ウェルへ移動させるために効果的な第2の時間の間電気泳動される、工程；および(6) この精製された核酸をこの回収ウェルから取り出す工程。この第1および第2の電気泳動

工程は、この核酸サンプル中の、所望の核酸の濃度と比較して、夾雜物の濃度を実質的に減少させるために有効であり、その結果精製された核酸を生成する。

【0019】

議論を容易にするために、本発明の方法は、2つのカテゴリに分けられる：このローディングウェルおよびこの回収ウェルが同じウェルである、単一ウェル方法、ならびに、このローディングウェルおよびこの回収ウェルが空間的に別個である、多重ウェル方法。

【0020】

(I. 一般的な考察)

(A. 核酸サンプル)

本発明の核酸サンプルは、任意の生きているかまたは死している生物学的な生物由来であり得る。サンプル核酸の例示的な供給源は、細胞、微生物、組織、血液、およびウイルスを含むが、これらに限定されない。

【0021】

本発明の核酸サンプルは、一般的に、3つの成分を含む：(1) 所望の核酸、(2) 1つ以上の核酸夾雜物、および(3) 1つ以上の非核酸夾雜物。所望の核酸は、臨界サイズ M^* を超えるサイズを有することによって特徴づけられる。ここで、 M^* の大きさは、多くの実験パラメーターの関数であり、このパラメーターとしては、電気泳動マトリクスの濃度および性質、使用される電場の型および大きさ、ならびに緩衝液の組成およびイオン強度が挙げられる。実際には、 M^* は、代表的には約20 k b pより小さい。

【0022】

逆に、核酸夾雜物は、核酸分子（例えば、RNAまたはDNA）であり、臨界サイズ M^* 未満のサイズを有することによって特徴づけられる。

【0023】

非核酸夾雜物は、所望の核酸の精製後の酵素処理（例えば、ポリメラーゼ、リガーゼ、または核酸基質を利用する他の酵素での処理）を妨げ得る任意の種を含む。例示的な夾雜物としては、タンパク質、ペプチド、高濃度塩、およびヘムが挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】

核酸サンプルを本発明の精製方法に供する前に、何度も核酸含有開始物質から核酸を単離することが必要である。このような開始物質は、種々の形態をとり得、これらとしては、2000万年前の化石化植物、ヒト遺体、毛髪、パラフィン包埋生検標本、琥珀に覆われた昆虫、細胞、血液、および組織標本などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、開始物質は全血である。明らかに、このような多様な開始物質は、各々が核酸単離のために使用される方法に対する特有の制約および要件を出している。しかし、一般的に、このような単離手順は、核酸サンプルから特定の任意の夾雜物を実質的に取り除き、そして核酸サンプルを実質的に可溶化するために少なくとも作用しなければならない。

【0025】

一般的に、適切な単離手順は、機械的または化学的手段による細胞の破壊、次いで、タンパク質を分解するか、または他の細胞のマクロ構造を破壊するためのタンパク質分解酵素での処理を包含する。例えば、血液から核酸サンプルを単離するために、2つの型の抽出アプローチが使用された：大規模なDNA精製に基づく「複雑な」方法、およびあまりサンプル操作を必要としない「簡単な」方法。

【0026】

「複雑な方法」は、一般的に、プロテイナーゼK消化またはタンパク質塩析、次いで、クロロホルム／フェノール抽出（またはシリカ粒子へのDNA吸着）、次いで、エタノールまたはイソプロパノール沈澱（Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第二版、Sambrookら編、CSH Press (1989)）に基づく。このようなプロトコルは、通常、高収率の比較的純粋なDNAを提供する。しかし、このような方法は、代表的には、比較的大きなサンプルサイズ（例えば、10mlの血液）を必要とし、毒性、揮発性（volatile）および／または爆発性試薬（例えば、フェノールおよびクロロホルム）を扱い、そして比較的時間がかかり、かつ骨の折れるプロトコルに基づき、これらは、自動化することは困難である。大規模なサンプル操作はまた、夾雜物およびDNA剪断の能力を増加させることを必要とす

る。いくつかの場合では、白血球または核単離工程は、PCR阻害を最小にするために必要とされる。これらの工程は、 $300\mu l$ 未満の血液が抽出のために利用可能であるときに、通常、困難である。なぜなら、このペレットサイズは少量であり、そして上清から効率的に単離することは困難であるからである。失敗したDNAエタノール沈殿もまた経験され得る。さらに、エタノール沈殿したDNAの完全な可溶化は時間がかかり、かつ達成することが困難である。この再可溶化の困難性もまた、固相支持体（例えば、シリカもしくはガラスビーズ、ガラス纖維ディスクまたは樹脂、および磁性ビーズ）上でのDNAの捕獲を必要とするプロトコルに当てはまる。不完全な捕獲、洗浄および脱離の間の保持に起因して、テンプレートを損失する可能性はまた、全てのDNA支持体—捕獲方法に対して一般的である。

【0027】

最も多くの部分に関して、「簡単な」プロトコル（例えば、磁性ビーズによるDNA精製）または「煮沸および実行（boil and go）」方法は、迅速かつ容易であり、通常は、 $10 \sim 50\mu l$ のサンプルサイズおよび最小の操作しか必要としない。（Dynal, Inc. のDynabeads DNA Direct Kit; Walshら、Biotechniques, 10:506 (1991)。）しかし、これらの方法を使用して得られるDNAサンプルは、代表的には低品質であり（すなわち、比較的低い $260/280$ 吸光度比（例えば、 $1.2 \sim 1.4$ ）によって特徴づけられる）、そして低いPCR収量（例えば、 $10 \sim 30\%$ ）である。「煮沸および実行」プロトコルでは、首尾よい抽出のために必要である温度（例えば、約 95°C を超える）は、通常、脆弱なDNA（例えば、ヒトゲノムの脆弱X領域）の回収に不適合性であり、そしてDNA変性を引き起こす。精製された核酸のこのような変性は、精製された核酸のさらなる酵素消化が所望される場合に問題である。なぜなら、一本鎖DNAは多くの一般の制限エンドヌクレアーゼの標的ではないからである。

【0028】

本発明の重要な局面において、新規なDNA単離手順は、タンパク質を消化し、または他の細胞のマクロ構造を破壊するためのタンパク質分解酵素での全血の

処理に基づいて記載される。この方法は、従来の方法と比較して、低濃度のタンパク質分解酵素のみが使用され、それによってPCR分析の前に酵素を除去する必要性が取り除かれるために、特に魅力的である。従って、本発明の方法を使用して、残った酵素を除去するために、「熱殺傷」処理、核酸サンプルの遠心分離および／または沈殿についての必要性が存在しない。さらに、サンプル操作が必要ないので、大きなインタクトな高分子量二本鎖DNAが、本方法を使用して回収され得る。このプロトコルは、最小のサンプル操作しか必要とせず、そして遠心分離を必要としないので、自動化に容易に受け入れられる。

【0029】

本発明の単離手順に従って、血液／溶解緩衝液混合物は、1容量の新鮮な血液を、6容量の溶解緩衝液および0.4容量のプロテイナーゼK溶液（例えば、約20mg/ml）と混合することによって形成される。好ましくは、新鮮な血液の基底容量は、約10～20μlである。好ましい溶解緩衝液組成は、1.4mlの溶解緩衝液が、1mlの110mM Tris-HCl (pH 8.3)、250mM NaCl、19mM サルコシル界面活性剤、0.05% Nonidet P-40、および0.4mlの2-ピロリジノン (pyrrolidine) からなる場合である。次いで、この血液／溶解緩衝液混合物は、約65℃で約35分間インキュベートされる。

【0030】

(B. 電気泳動マトリクス)

本発明において使用される電気泳動マトリクスは、多くの従来技術のうちいずれか1つを用いて形成され得る。一般的には、電気泳動マトリクスは、マトリクスを含まない媒体中の核酸の移動と比較して、所望の核酸の電気泳動的移動を遅らせるために有効である。さらに、このマトリクスは、所望の核酸と夾雑物との間で差次的な電気泳動的移動を与えるなければならない。さらに、ゲルマトリクスの完全性は、電気泳動中に遭遇し得る温度上昇において維持されなければならない。本発明の特定の好ましい実施態様において、マトリクスはまた、M*より大きなサイズを有する核酸を実質的に排除するか、そして／または所望の核酸に対して電場依存性の電気泳動的移動を与える。

【0031】

電気泳動マトリクスは、従来の「湿式ゲル」フォーマットまたは「乾式ゲル」フォーマットで処方され得る。湿式ゲルフォーマットにおいて、電気泳動をもたらすために使用される電極は、緩衝液レザーバ中に配置され、そして泳動緩衝液中に浸漬され、そして電極とマトリクスとの間の電気的連絡は、泳動緩衝液によって確立される。さらに、湿式ゲル構成において、マトリクスの上端表面は、泳動緩衝液の薄膜（例えば、少なくとも約5mmの深さ）で覆われる。

【0032】

一方で、乾式ゲルフォーマットでは、緩衝液レザーバは存在しない。代わりに、電極は、マトリクスに直接接触している。いくつかの代替の乾式ゲル電極構成が使用され得る。例示的な乾式ゲル電極構成としては、金属の平面シート、金属ワイヤの格子、またはゲルの体部に貫入する一連の金属ピンが挙げられる。好ましくは、電極を形成するために使用される金属は、プラチナまたは別の類似の化学的に不動態化された材料である。好ましくは、緩衝液で飽和されたスポンジ材料は、いくらかマトリクスの収縮を提供する電極の近傍でマトリクスの融解を引き起こすことなく、電極とマトリクスとの間の電気的連絡を提供し、そして電気泳動緩衝液のためのレザーバとして働くために、電極と電気泳動マトリクスとの間に配置される。一般的に、より低い場の強度は、ゲル完全性を保護するために乾式ゲルで使用されるに違いない。事実、ゲルは、高電場強度が使用される場合に電極の近傍で融解する傾向があり得る。さらに、ゲル内に捕捉された少量の緩衝液は、一般的に、電気泳動中の電流および伝導度を安定化するためには十分ではない。イオンの消耗は、一般的な現象である。結論として、（特に、数分後に）抵抗は時間依存性であり、そしてしばしば、場の極性に依存する。厚いゲル（すなわち、約5～10mmの厚さを有するゲル）は、いくらかこれらの問題を低減させる。

【0033】

本発明の特定の好ましい実施態様において、マトリクスは、実質的な電気的浸透圧流（electroosmotic flow）（例えば、 $2 \cdot 0 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vs}$ より大きい）を生じることが望ましい。このような電気的浸透圧流

は、所望の核酸をウェル中に保持しながら、ローディングウェルから夾雑物を一掃するように働き得る。一般的に、荷電した基を含むマトリクスは、電気的浸透圧流を支持する（例えば、特定のアガロースマトリクス（例えば、Sigma Chemical Companyにより供給される「High EEO」アガロース材料））。

【0034】

例示的な電気泳動マトリクスとしては、アガロースおよび架橋化ポリアクリルアミドが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、このマトリクスは、ゲル化アガロースである。より好ましくは、このアガロースは、約85℃を超える融解温度を有する高融解アガロースである。

【0035】

ローディングウェルおよび回収ウェルは、緩衝溶液を含む電気泳動マトリクスにおいて形成されたマトリクスを含まない領域である。サンプル核酸は、精製前にローディングウェルに配置され、そして精製された核酸は、精製の後に回収ウェルから取り出される。ローディングウェルおよび回収ウェルは、同じウェルであってもよいし、異なるウェルであってもよい。ウェル中にマトリクスが存在しないので、サンプル核酸の配置および精製された核酸の回収は、ゲルマトリクスから精製された核酸を切り出すことなく達成され得る。ウェルの形状は任意であるが、本発明のウェルは、実質的に平面の底および電気泳動の方向に実質的に平面の壁を有することが好ましい。なぜなら、非平面の底は、ウェルの近位で電場に負の影響を与え得、そして電気泳動の方向に非平面の壁は、電気泳動中のサンプルバンドの形状に悪影響を与え得るからである。さらに、ウェルの深さは、電気泳動マトリクスの厚さ未満であるべきである（すなわち、ウェルの底は、マトリクス支持部材によってではなく、マトリクスによって形成されるべきである）。

【0036】

毛管現象は、マトリクスが調製されるとき（例えば、アガロースゲルが注がれるとき）、ローディングウェルおよび回収ウェルを形成するために使用されるコームと接触して、電気泳動マトリクスをコーム上に引き上げるために生じ得る。

この毛管現象は、ゲルの厚さを、ゲルの体部より2つの隣接するウェルの間でより厚くさせる。この増加した厚さは、電場をウェルの近傍で不均質にさせ得る。この不均質な電場を除去することは、再現性のある結果および精製された核酸の最大収量を確実にするために重要であることが発見された。この問題は、毛管現象を引き起こさない材料から作成されたコームを使用することによって、またはかみそりの刃を使用してウェル周辺にはみ出したいずれのゲルを切り取ることにより解決され得、それによって均一に平面な先端表面を有するゲルが生成される。

【0037】

使用される電気泳動緩衝液は、任意の従来の電気泳動緩衝液であり得る。好ましい緩衝液は、低伝導率を有し、それによって電気泳動中に発生するジュール熱の量を減少させ、そして核酸と有害に相互作用しない。さらに、緩衝液は、引き続く精製された核酸の酵素処理に適合性（例えば、PCRプロセスと適合性）であるべきである。従って、好ましくは、回収ウェル緩衝液は、低塩濃度かつ低いオノン強度を有する（例えば、0.04M Tris、0.04M 酢酸および0.002M EDTAからなるTAE緩衝液）。

【0038】

電気泳動マトリクスは、水平または垂直に配向され得る。水平な配向では、電気泳動の方向は平行方向であるが、垂直な配向では、電気泳動の方向は垂直方向である。一般的に、水平配向は、湿式ゲルフォーマット、および複数ウェル法（以下を参照のこと）が使用される場合に好ましい。

【0039】

本発明の電気泳動マトリクスの特定の好ましい実施態様において、マトリクスは、寒天を含浸させた焼結プラスチックから構成されるゲル／プラスチック複合材料を形成することによって構築される。これらのマトリクスは、支持されていないゲル材料と比較して増強された構造完全性を提供するために、好ましい。

【0040】

本発明のゲル／プラスチック複合材料において有用である、例示的な焼結プラスチックは、いくつかの製造業者によって生成される（例えば、Porex T

technologies, Inc. およびGenPore, Inc.)。一般的に、これらの焼結プラスチックは、開口セルの全方向性孔の複雑なネットワークによって特徴づけられる。これらの孔（これは、7～250ミクロンの平均孔サイズで構成され得る）は、孔性プラスチックに構造的強度を与える。ポリマーのいくつかの型は、焼結プラスチックを形成するために組み合わせて使用される（例えば、高密度ポリエチレン（HDPE）、超高分子量ポリエチレン（UHMW）、ポリプロピレン（PP）、ポリフッ化ビニリデン（PVDF）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ナイロン6（N6）、ポリエーテルスルホン（PES）、およびエチルビニルアセテート（EVA））。

【0041】

複合材料を形成するために、焼結プラスチックのシート（例えば、PORTEX 250ミクロン孔サイズポリプロピレン（12インチ×12インチ×1/4インチ））を所望の寸法（例えば、縦3.0cm×幅11.7cm）に切断する。次いで、平面底のウェルは、プラスチックに穴を開ける（例えば、深さ約3mm～5mmおよび直径5mm）。ウェルは、プラスチックシートの下側の表面を貫通すべきではない。次いで、プラスチックの親水性を増すために、孔性プラスチック片を湿潤剤（例えば、70%エタノール）に浸漬するか、または例えば、Metroline Industries Inc. に提供されるように、プラスチック表面上に親水基（-OH、-COOH、または-NH）を導入する高压プラズマ処理で処理する。一旦焼結プラスチックが、それを十分に親水性にするように処理されると、融解されたアガロースに接触される（例えば、沸騰アガロース（0.2×TAE緩衝液中に0.8～3.0%溶解）に入れられる）。このアガロースは凝固させられ、そしてプラスチックの外側表面に付着したこの凝固アガロースは、機械的に切り取られる。次いで、この寒天含浸プラスチックを、電気泳動タンクに配置し、そして電気泳動緩衝液に（例えば、5mmの深さまで）浸漬する。電圧が、一般的に、非複合材料マトリクスと比較して、実質的に低減されることを除いて、非複合材料マトリクスと同じ様式で電気泳動を行う。

【0042】

(C. 電場)

本発明の種々の実施態様で使用される電場の大きさは、多くの因子に依存するが、一般的に、サンプル精製に必要とされる時間を低減するために、最大の可能な電場強度が用いられる。最大電場の値は、電気泳動マトリクスの能力によって制限されて、電気泳動中に発生したジュール熱によって引き起こされる温度上昇に逆らう。電気泳動によって発生したジュール熱の量は、多くの因子によって決定され、これらの因子としては、電気泳動マトリクスの厚さ、電気泳動緩衝液のイオン強度および伝導率、電場強度、ならびに核酸サンプルのイオン強度および伝導率が挙げられる。最小電場の値は、電場が夾雑物および／または所望の核酸をローディングウェルからおよび／またはローディングウェルへ輸送する能力によって制限される。好ましくは、5～15V/cmの間の電場が本発明で使用される。

【0043】

本発明の特定の実施態様において、時間依存性電場を使用して、所望の核酸と夾雑物との間の差次的な移動、および精製された核酸の効率的な回収を増強する。第1の型の時間依存性電場は、流体捕捉交流電場 (liquid-trapping-alternating-current-field)、すなわち「LITAC」場と本明細書中でいわれる。LITAC場の影響下では、所望の核酸は、電気泳動マトリクスにおける有限の順方向速度を有するが、遊離の溶液中(すなわち、ローディングウェルおよび回収ウェル)では、ゼロの正味速度を有する。さらに、LITAC電場の影響下では、夾雑物は、マトリクスおよび遊離の溶液中の両方において、ゼロの正味速度を有する。LITACに誘導される移動のこの特性は、以下で詳細に記載されるいくつかの有用な目的を提供する。

【0044】

一般的に、LITAC場は、順方向時間 t_F 、順方向電場 E_F 、逆方向時間 t_R 、および逆方向電場 E_R によって特徴づけられる。より詳細には、LITAC場は、以下の、 t_F 、 E_F 、 t_R 、および E_R の間の関係によって特定される：(1) 順方向時間および順方向電場の積は、逆方向時間および逆方向電場の積に等しい。すなわち、

$$t_F * E_F = t_R * E_R ;$$

(2) 順方向電場は、逆方向電場より大きい；および(3) 時間 t_F および t_R は、各々が、所望の核酸が回収ウェルに移行するために必要な時間より短く（例えば、約30秒）、かつ所望の核酸の再配向時間より長い（例えば、約1秒）ように選択される。好ましくは、 E_F/E_R は、約2と3との間であり、そしてより好ましくはこの比は、約2.4である。プロセスを促進するために、 E_F の値を、電気泳動システムと適合性である最大電場であるように選択する（すなわち、ゲルマトリクスを融解しないか、そうでなければゲルマトリクスを分解しない最大電場）。

【0045】

本発明の状況で有用である第2の型の時間依存性電場は、ゼロ総和速度電気泳動電場 (zero-integrated-velocity-electro-phoresis field)、すなわち、ZIVEと本明細書中でいわれる。LITAC場と対照的に、ZIVE場の影響下では、電気泳動マトリクスにおいて、夾雑物が有限の順方向正味速度を有しながら、所望の核酸はゼロ正味速度を有する。

【0046】

一般的に、ZIVE場は、順方向時間 t_F 、順方向電場 E_F 、逆方向時間 t_R 、逆方向電場 E_R 、順方向電場の影響下での順方向電気泳動速度 V_F 、および逆方向電場の影響下での逆方向電気泳動速度 V_R によって特徴づけられる。より詳細には、ZIVE場は、以下の、 t_F 、 E_F 、 t_R 、 E_R 、 V_F 、と V_R との間の関係によって特定される：(1) 順方向時間および順方向速度の積は、逆方向時間および逆方向速度の積に等しい。すなわち、

$$t_F * V_F = t_R * V_R ;$$

(2) 順方向電場は、LITAC場について上記で記載されるように、最大値で設定される；(3) 逆方向電場は、順方向電場より小さく、ここで、 E_F/E_R は、好ましくは、約2と3との間であり、そしてより好ましくはこの比は、約2.4である；(4) t_F は、所望の核酸の再配向時間より長く、かつ所望の核酸がマトリクスから移動する時間より短いように選択される。好ましくは、順方向時間は、約5秒より長く、そしてより好ましくは、約5秒と5分との間である。

【0047】

(I I . 精製方法)

(A. 単一ウェル方法)

本発明に従う単一ウェル方法は、ローディングウェルおよび回収ウェル（これらは同一ウェルである）によって特徴づけられる。すなわち、核酸サンプルは、精製された核酸が取り出されるウェルと同じウェルにロードされる。単一ウェル方法は、複数ウェル方法に対していくつかの利点を有し、これらの利点としては、以下が挙げられる：（1）通常は電気泳動媒体に入らない大きなゲノム核酸が回収され得る、（2）精製されたサンプルが第2のウェルを遮断する必要がない、および（3）より多くのサンプルが、サンプルにつきわずか1つのウェルしか必要としないために、所定の量の電気泳動媒体で処理され得る。しかし、単一ウェル方法の重大な欠点は、非移動性の夾雑物（例えば、中性の夾雑物および大きな凝集物）が、所望の核酸から分離され得ないことである。

【0048】

（夾雑物希釈態様） 本明細書中で「夾雑物希釈態様」といわれる第1の単一ウェル方法は、図1 A～Eに模式的に示される。この実施態様において、サンプル核酸は、時間 t_1 で印加された大きさ E_1 を有する第1のDC電場の影響下で第1の電気泳動に供される。この第1の電気泳動は、電気泳動マトリクス 15 を通じて夾雑物希釈レザーバ 20 へと、 M^* より大きな臨界サイズ、 L^* 未満の距離を有する所望の核酸 30 を輸送し、そしてローディング／回収（L/R）ウェル 10 から移動性の夾雑物 5 を輸送するために十分である。図1 A～Dを参照のこと。一旦移動性の夾雑物の選択された部分が、マトリクスから夾雑物希釈レザーバ へと泳動されると、それによって 25 を希釈し、サンプル核酸は、時間 t_2 にわたって印加される大きさ E_2 を有する第2のDC電場の影響下で第2の電気泳動に供される。ここで E_1 および E_2 は、同じであってもよいし、異なってもよい。この第2の電気泳動は、所望の核酸 30 を L/R ウェル 10 へと後方に輸送するために十分である。図1 D～Eを参照のこと。

【0049】

夾雑物希釈レザーバは、核酸サンプル中の夾雑物の濃度に比例してレザーバに

入る夾雑物を実質的に希釈するのに十分な量の緩衝液を含む。好ましくは、夾雑物希釈レザーバは、電気泳動用マトリクスの容量の少なくとも6倍に等しい量の緩衝液を含む電極緩衝液レザーバである。

【0050】

所望の核酸の回収を容易にするために、第2の逆方向電場は、代表的には同じ大きさおよび持続期間を有するが、第1の順方向電場と逆の極性を有する。さらに、第1の電気泳動の時間を調節することによって、精製度および所望の核酸の回収効率が、調節され得る。すなわち、より長い t_1 は、一般に、所望の核酸の精製度を増加するが、回収効率の減少を提供することを示す。好ましくは、本発明のこの実施態様に従って、第1および第2の電場は、約10～12V/cmの電場の強さを有するDC電場である。

【0051】

捕捉様式。本明細書中で「捕捉様式」と呼ぶ第2の單一ウェル方法は、図2A～Dに概略的に図示される。この様式は、バルク領域およびウェルーマトリクス界面領域を含む電気泳動マトリクスを必要とする。ここで、このウェルーマトリクス界面領域は、所望の核酸を捕捉するのに有効であり、これによって、このような核酸がマトリクスのバルク領域に進入するのを防ぐ。このようなマトリクスは、高濃度のマトリクスピリマー（例えば、30mg/mLアガロース）を使用して、形成され得る。

【0052】

この実施態様において、サンプルの核酸を、時間 t_1 間適用した大きさ E_1 を有する第1のDC電場の影響下で、第1の電気泳動に供される。この第1の電気泳動は、L/Rウェル10の外側、電気泳動マトリクス15中へ移動性夾雑物5を輸送し、そしてL/Rウェルの外側、マトリクスのウェルーマトリクス界面領域中へ所望の核酸30を輸送するのに十分である。図2A～Bを参照のこと。一旦、夾雑物がL/Rウェルの外側、そして電気泳動マトリクスの中に輸送されると、いくつかの選択肢が所望の核酸をL/Rウェルへ戻すために存在する。

【0053】

第1の選択肢において、任意のさらなる電気泳動工程を伴わない第1の電気泳

動の終了後、所望の核酸をL/Rウェル10から取り出す。この選択肢に従って、所望の核酸を、L/Rウェル中に局在する緩衝液の単純な拡散および/または穏かな攪拌によって、ウェルーマトリクス界面領域から取り出す。図2Cを参照のこと。

【0054】

第2の選択肢において、所望の核酸を、界面領域から取り出し、そして時間 t_2 （ここで、 $t_2 \ll t_1$ ）間適用した大きさ E_2 を有する第2のDC電場の影響下で、第2の電気泳動にサンプルの核酸を供することによって、L/Rウェル10へ戻す。図2Dを参照のこと。この時間 t_2 は、2つの理由のために時間 t_1 より有意により短くなくてはならない。第1に、 t_2 が長すぎる場合、所望の核酸は、界面領域から外へL/Rウェルを横切り、そしてL/Rウェルの反対の壁へ輸送され、それによって、所望の核酸はその後の回収に利用不能となる。第2に、 t_2 が長すぎる場合、夾雑物は、輸送されてL/Rウェルに戻り、それによって、所望の核酸を再び混入させる。例えば、 t_1 は代表的には、約15~30分であり、一方 t_2 は約30秒である。

【0055】

本発明の捕捉様式の第2の選択肢の実施態様の改変において、第1および/または第2の電気泳動の一部あるいは全部は、DC電場ではなくLITAC電場を用いて実行される。所望の核酸をL/Rウェルに輸送して戻すためにLITAC電場を使用することは、以下を含むいくつかの利点を提供する：(1) この移動性夾雑物がLITAC電場の影響下ではL/Rウェルに戻り得ない、および(2)所望の核酸は、一旦それがウェルに戻ると、L/Rウェルの外側へ移動し得ない。好ましい実施態様において、第1の電気泳動はDC電場のみを使用し、そして逆方向電気泳動は、DC電場およびLITAC電場の両方を使用する。

【0056】

LITAC逆方向電場様式。本明細書中で「LITAC逆方向電場様式」と言われる第3の单一ウェル方法を、図3A~Cに概略的に図示する。この様式において、サンプルの核酸を、大きさ E_1 を時間 t_1 間適用する第1のDC電場の影響下で、第1の電気泳動に供する。この第1の電気泳動は、所望の核酸30および

L/Rウェル10の外側、電気泳動マトリクス15中に移動性夾雜物5を輸送するのに十分である。図3A～Bを参照のこと。一旦所望の核酸および夾雜物が電気泳動マトリクス中に輸送されると、そのサンプル核酸は、所望の核酸30がL/Rウェル10に戻り、そしてマトリクス中の夾雜物を固定するのに十分なLITAC電場の影響下で、第2の電気泳動に供される。図3BおよびCを参照のこと。

【0057】

(C. 多重ウェル法)

本発明による多重ウェル法は、空間的に異なるローディングウェルおよび回収ウェルによって特徴付けられる（すなわち、核酸サンプルを、精製された核酸が取り出されるウェルとは異なるウェルにロードする）。多重ウェル法は、所望の核酸が非移動性夾雜物（すなわち、中性の夾雜物または大きな凝集体）から分離され得るという利点を有する。しかし、多重ウェル法は以下を含むいくつかの欠点に悩まされる：（1）電気泳動媒体に進入しない大きなゲノム核酸は、回収され得ない、（2）所望される核酸の電気泳動の軌道は、精製された核酸が、回収用ウェルを妨害するように注意深く制御されなくてはならない、そして（3）サンプル当たり複数のウェルが要求されるので、より少ないサンプルが、電気泳動媒体の所定の領域で処理され得る。

【0058】

單一方向多重ウェル様式。本明細書中で「單一方向多重ウェル様式」と言われる第1の多重ウェル法は、図4A～Dに概略的に図示される。この実施態様において、サンプル核酸を、大きさE₁を時間t₁間適用する第1のDC電場の影響下で、第1の電気泳動に供する。この第1の電気泳動は、所望の核酸30および移動性夾雜物5を、ローディングウェル11の外側、そして電気泳動マトリクス15を通して輸送するのに十分である。図4A～Cを参照のこと。第1の電気泳動の持続期間は、夾雜物を、回収ウェル12を通して回収ウェル12を通りすぎた位置へ輸送し、そして所望の核酸を回収ウェル12中へまたはその近くへ輸送するのに十分であるように選択される。図4C～Dを参照のこと。回収ウェル中の所望の核酸の配置は、2つの方法のうちの1つを用いてもたらされ得る。第1の

方法において、所望の核酸の移動速度ならびにローディングウェルと回収ウェルとの間の距離を知り、第1の電気泳動後に所望の核酸が回収ウェルに位置するように移動時間を調節することによって、この所望の核酸を回収ウェルに位置させる。この「タイミングに基づく」方法は、より好ましくない。なぜならば、それは特定の実験条件下で、所望の核酸の移動特性の知識が先に必要とされるからである。回収ウェル中に所望の核酸を回収するためのより好ましい方法において、一旦夾雑物が回収ウェルを通過したら、LITAC電場を使用して所望の核酸を、ローディングウェルと回収ウェルとの間の位置から回収ウェルへ輸送する。この工程中LITAC電場を使用することによって、所望の核酸は、回収ウェルへ輸送され、そして無期限に回収ウェルに残る。

【0059】

多重方向多重ウェル様式。本明細書中で「多重方向多重ウェル様式」としていわれる第2の多重ウェル方法を図5A～Dに概略的に図示する。特定の状況において、多重方向多重ウェル様式は、單一方向多重ウェル様式よりも好ましい。なぜなら、前者の様式において、移動性夾雑物は、回収ウェルを通過しないからである。この実施態様において、核酸サンプルを、大きさ E_1 を時間 t_1 間適用する第1のDC電場の影響下で第1の電気泳動に供する。この第1の電気泳動は、所望の核酸30および移動性夾雑物の実質的な部分を、ローディングウェル11の外側、そして電気泳動マトリクス15を通って輸送するのに十分である。所望の核酸は、回収ウェル12と整列された中間地点に輸送される。次に、核酸サンプルを、所望の核酸を回収ウェル12の中にまたは回収ウェル12の近くに輸送するのに十分な第2の電気泳動に供する。次いで、上記のタイミング方法またはLITAC電場のいずれかを用いて、所望の核酸を回収ウェルに位置させる。

【0060】

(I I I. 実施例)

本発明は、以下の実施例を考慮してさらに明白になる。この実施例は、本発明の純粹な例示であることを意図され、その範囲を決して限定しない。

【0061】

(実施例1)

(夾雜物希釈分取電気泳動による λ DNAの精製)

(核酸サンプル)

精製されるべき核酸は、非消化の λ DNA(48.5kb長)、およびHindIII制限酵素を用いて λ DNAを消化した後に得られたDNAフラグメント(すなわち、0.6、2.0、2.3、4.4、6.6、9.4および32.1kb長のフラグメント)からなった。電気泳動に供された核酸サンプル(全量で40μL)を、20μL(1.66μg)のHindIII消化された λ DNA、10μL(0.42μg)の非消化 λ DNA、および11μLの水を混合することによって調製した。

【0062】

(電気泳動装置および条件)

電気泳動を水平方向で実施した。使用した電気泳動マトリクスは、Promegaより販売される分子生物学的グレードのアガロースで作製した0.8%アガロースゲルであった。このゲルは、長さ3.0cm、および幅11.7cmであった。各々は、ゲルの先端から約1cmに位置され、それによって、電気泳動の方向において2.0cmのゲルを提供した。このウェルは、約2.5mm離れて配置された。ゲルおよびタンク緩衝液の両方は、0.2×TAEであった(ここで1×TAEは、0.04M Tris、0.04M 酢酸、および0.002M EDTAである)。ウェルは、深さ5mm、幅1mm、および長さ3.8mmであった。

【0063】

電気泳動を27.2×12cm幅のH5ゲル電気泳動タンク(Gibco BRL, Life Technologies)で実施した。順方向および逆方向の両方の電場は、10.6V/cmの大きさを有した。ゲルを横切る電場、およびタンク緩衝液の温度を、Model 2706マルチメーター(BK Precision, Chicago, IL)を用いてモニターした。864mLの緩衝液をタンクに加えた。これは、緩衝液の5mm層下にゲルを浸すのに十分な量である。

【0064】

(電気泳動プロトコル)

上の調製された核酸サンプルを、ローディング／回収ウェルにロードし、そして順方向電気泳動を28分間の時間で実行した。次いで、この電場をオフにし、そして $120\mu\text{l}$ のサンプルをローディング／回収ウェルから取り出した（逆方向電場0分のサンプル時間）。次に、電場を逆にし、そしてそれ以降（電場をオフにせず）次の27分間 $120\mu\text{l}$ のサンプルをローディング／回収ウェルから1分毎に回収し、計28サンプルを採取した。（最初に $40\mu\text{L}$ のみのサンプルを含むウェルから $120\mu\text{L}$ のサンプルを採取したという事実は、そのゲルが5mmの緩衝液で覆われ、そしてウェル中に存在するDNAのほとんどが、所定の時間で採取されることを確認するためにより多い量の液体をそのウェルから回収する必要があるという事実に起因した。27の採集されたサンプルの各 $20\mu\text{L}$ （逆方向電気泳動の1～27分に採取されたサンプルに対応する）を次いで、精製された核酸の量および大きさを決定するために、分析用電気泳動に供した。

【0065】

分析用電気泳動は、 $t = 0$ で採取されたサンプルが、比較的多くの量の非消化 $4.8.5\text{k b DNA}$ （およそ $9\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度と見積もられた）を含むが、 $t = 1$ 分で採取されたサンプルは、 $4.8.5\text{k b}$ のDNAフラグメントのおよそ5倍より多い量を含むことを示した。対照的に、2分後に採取されたサンプルは、 $4.8.5\text{k b}$ のフラグメントよりおよそ50%少ない量を含み、次いでサンプルを1分後に採取した。2分～18分に採取された各々のサンプルは、小さいが、漸増する量の $4.8.5\text{k b}$ のDNAフラグメントを含んだ。19分後に採取されたサンプルもまた、少量の $2.3.1\text{k b}$ のDNAフラグメント、ならびに非常に少量の $9.4.6.6$ 、および 4.4k b のDNAフラグメントを含んだ。これらの4つより小さいDNAフラグメントの量は、漸進的に19分に得られたサンプルから、24分に得られたサンプルまで増加し、24分に得られたサンプルが最も高く、25分に得られたサンプルではわずかに減少し、26分に得られたサンプルではさらに減少し、そして27分に得られたサンプルでは、実質的に検出不能であった。ゲルの視覚的試験に基づいて（すなわち、24分に得られたサンプルの相対強度とこのゲルにおける λ DNA標準と比較することによって）、

24分に得られたサンプルは、最初にゲルにロードされたDNAの約25%を示すと見積もられた。

【0066】

上記の実験の知見に基づいて、いくつかの観察がなされ得る。48.5kbのDNAフラグメントがt=0のサンプルにおいて観察されたという事実は、いくつかの48.5kb DNAフラグメントが、順方向電気泳動の28分後でさえも、ゲルに進入しなかったことを示す。逆方向電気泳動の1分後に採取したサンプルにおいて、より多くの量の48.5kbのフラグメントが観察されたという事実は、比較的大きな画分の48.5kbのDNAフラグメントは、順方向電気泳動の28分後にかろうじてゲルに進入したが、1分の逆方向電気泳動は、このDNAをローディング／回収ウェルに戻すのに十分であったことを示す。逆方向電気泳動の2分～18分後に得られたサンプル中で少量（および漸増量）の48.5kbフラグメントが観察されたという事実は、DNAが異なる程度でゲルに進入したことを示す。4.4kbよりも小さなDNAフラグメント（すなわち、2.2および2.0kbフラグメント）が全く観察されなかつたという事実は、それらがゲルからサンプル希釈容量（すなわち、緩衝液で満たされた電極レザーバ）へ溶出されたという事実に起因するようである。DNAフラグメントは、順方向および逆方向で異なる電気泳動的移動度を示した、すなわち順方向に28分間移動したフラグメントは、もとのウェルに戻るのに28分間未満かかったという事実は、電気泳動中に、ゲルの温度が上昇したことを示す（ジュール効果）。

【0067】

(実施例2)

(多重方向多重ウェル分取電気泳動によるλDNAの精製)

(核酸サンプル)

核酸サンプルは、上記の実施例1に記載のものと同じであった。

【0068】

(電気泳動装置および条件)

電気泳動を水平方向で実施した。使用した電気泳動マトリクスは、Promegaより販売される分子生物学的グレードのアガロースで作製された0.8%ア

ガロースゲルであった。このゲルは、長さ3.5cm、および幅11.7cmであり、そして $11.7 \times 11.7\text{ cm}$ のトレイで支持されていた。複数の方向での電気泳動を可能にするために、このトレイは側面の部材を有さなかった。代わりにこのゲルトレイは、4つの角のそれぞれに、1つの電極ポストを含んだ。アガロースゲルが電極ポストを汚すのを防ぐために、ゲルの調製中これら4つのポストの周りをマスキングテープで覆い、そして電気泳動前にこのテープを除去した。ローディングウェルは長方形の形（深さ2mmで、幅4mm）をしており、そしてゲルの先端から約1cmに位置した。回収ウェルはまた、長方形の形であり、そして5.3mmの厚さおよび3mm幅であった。回収ウェルは、開始ウェルの6mm前に位置し、そして開始ウェルの2.3mm左に位置した（ウェルを上側にしてゲルを見た場合）。ゲルおよびタンク緩衝液はともに、 $0.2 \times \text{TAE}$ であった。

【0069】

電気泳動を、 $27.2 \times 12\text{ cm}$ H5ゲル電気泳動タンク（Gibco BRL, Life Technologies）において実施した。順方向および横方向の電場はともに、大きさ 11.5 V/cm を有した。ゲルを横切る電場、およびタンク緩衝液の温度を、Model 2706マルチメーター（multimeter）（BK Precision, Chicago, IL）を用いてモニターした。 870 mL の緩衝液をタンクに添加した。これは、緩衝液の5mm層下でゲルが浸るのに十分な量である。

【0070】

（電気泳動プロトコル）

核酸サンプルをローディングウェルにロードし、そして順方向の電気泳動を16分間実施した。次いで、この電場を消し、ゲルを手動で 90° 回転した。そして、ここで横方向の電場を起こした。 $100\text{ }\mu\text{L}$ のサンプルを、横方向の電場を開始した3分後から横方向の電場を開始して10分後まで（電場をオフにすることなく）毎分ごとに、回収ウェルから採取した。計8サンプルを採取した。次いで、採取した8つの各サンプル（横方向電気泳動の開始後3～10分に採取されたサンプルにそれぞれ対応する） $20\text{ }\mu\text{L}$ を、回収されたDNAの量およびサイ

ズを決定するために、分析用電気泳動に供した。

【0071】

分析用電気泳動は、横方向電気泳動の開始後、時間3、4および5分後に得られたサンプルが、検出可能なDNAを含んでいないことを示した。6分後に採取されたサンプルは、いくつかの4.8、5、2.3、1、9、4、6、6、および4.4kbのDNAフラグメントを含んだ。7分後に採取されたサンプルは、6分後に採取されたサンプルと同じ5つのDNAフラグメントを、わずかに多く含んだが、8、9、および10分後に採取されたサンプルは、これら5つのフラグメントの量を段階的に減少する量で含んだ。分析用ゲルの視覚的な実験に基づいて（すなわち、7分後に得られたサンプルの相対強度をDNA内部標準と比較することによって）、7分後に得られたサンプルは、分取ゲル上に最初にロードされたDNAの約10%を示すと評価された。

【0072】

上記の実験の知見に基づいて、いくつかの観察がなされ得る。7分の前または後のいずれかに得られたサンプル中より、7分後に得られたサンプル中により多くのDNAが存在するという事実は、7分より前にはDNA分子は回収ウェルにまだ達しておらず、7分より後には回収ウェル中に存在したDNAはウェルを離れ始めていたことを示す。4.4kbより小さいDNAフラグメント（すなわち2.2および2.0kbのフラグメント）が検出されないという事実は、それらが、横方向電気泳動により物質が回収ウェルに移動する点を過ぎて移動した、すなわち、横方向電気泳動の間、より小さなフラグメントの軌道は、回収ウェルを途中で捕らえなかつたために、それらが喪失したことを示す。

【0073】

(実施例3)

(単一方向多重ウェル分取電気泳動による血液からのゲノムDNAの精製)

(核酸サンプル)

精製目的で血液サンプルを調製するために、血液サンプルを溶解用緩衝液と混合し、次いで、血液／溶解用緩衝混合液を温度を上昇させてインキュベートした。血液／溶解用緩衝混合液を、10μLの新鮮な血液（すなわち、1ヶ月未満）

と、 $30\mu\text{L}$ の溶解用緩衝液および $3.6\mu\text{L}$ のプロテイナーゼK ($20\text{mg}/\text{mL}$)を混合することによって、生成した。ここで、 1.4mL の溶解用緩衝液は、 1mL の $110\text{mM}\text{ Tris-HCl}$ (pH 8.3)、 $250\text{mM}\text{ NaCl}$ 、 19mM サルコシル界面活性剤、 0.05% ノニデットP-40、および 0.4mL の2-ピロリジノンからなった。次いで、血液／溶解用緩衝混合液を、 0.5mL チューブにおいて 65°C で 35 分間インキュベートした。

【0074】

(電気泳動装置および条件)

電気泳動マトリクスは、 0.8% アガロースゲルであり、上記のように作製した。このゲルは、 $2.2 \times 11.7\text{cm}$ であった。ローディングウェルは、厚さ 1mm および幅 5mm であった。回収ウェルは、厚さ 2mm および幅 5mm であった。回収ウェルはローディングウェルから 5mm のところに位置した。ゲルおよびタンク緩衝液は両方とも、 $0.2 \times \text{TAE}$ であった。

【0075】

電気泳動を、 $27.2 \times 12\text{cm H5}$ ゲル電気泳動タンク (Gibco BRL, Life Technologies)において実施した。そして順方向の電場は、大きさ 10.6V/cm を有した。ゲルを横切る電場、およびゲルタンク緩衝液の温度を、Model 2706マルチメーター (BK Precision, Chicago, IL) を用いて測定した。 870mL の緩衝液をタンクに添加した。これは、緩衝液の 5mm 層下にゲルが浸るのに十分な量である。

【0076】

(電気泳動プロトコル)

3つの核酸サンプル (各 $20\mu\text{L}$ の溶解した血液および消化した血液) を3つの隣接するローディングウェルの第1セットにロードした。順方向電気泳動 (10.6V/cm において) を1分間実施し、その後に電場を中断し、そして3つのDNAサンプルの第2のセットを、3つの隣接するローディングウェルの第2のセットにロードした。3つのDNAサンプルの別の3セットをそれぞれ、1分間隔でロードされた計15のDNAサンプルについて同じ様式で、さらに3つの

ローディングウェルのセットにロードした。電気泳動（10.6V/cmにおいて）を、最後のサンプルセットをロードした後16分間実施した。従って、これらの3サンプル各々の5つのセットは、それぞれ、20、19、18、17および16分に移動したサンプルに対応した。

【0077】

最初の順方向電気泳動に続いて、ゲルをEtBrで染色し、そして視覚的に試験した。この試験により、16、17、および18分間移動させたサンプル中に存在するほとんどのDNAは、それらに対応する回収ウェルに到達しなかったこと、19分間移動させたサンプル中に存在するDNAは、それらに対応する回収ウェルに到達したこと、および20分間移動させたサンプル中に存在するDNAは、それらに対応する回収ウェルを通過して移動したことが明らかになった。

【0078】

上記の実験の知見に基づいて、いくつかの観察がなされ得る。第一に、この方法を成功させるために、慎重に制御されるべき最適な泳動時間が存在する。すなわち、DNAは、電気泳動時間が短すぎる場合、回収ウェルに到達せず、そしてDNAは、電気泳動時間が長すぎる場合、回収ウェルを通過して移動する。第二に、精製核酸の回収率が低い（約15%）。なぜなら、たとえ最適な時間（例えば、本実施例において19分）であっても、多くのDNAは、依然としてローディングウェルと回収ウェルとの間のゲル中に位置されるからである。低回収率の原因となる別の因子は、ローディングウェルにロードされたDNAの大部分（おそらく、50%まで）が、ローディングウェルを全く離れないことである。これは、この不動のDNAは大きすぎてゲルに入らないという事実に起因するようである。低回収率の原因となるさらに別の因子は、ゲル電気泳動槽中の緩衝液の水位を、緩衝液がゲルをもはや覆えないぐらい低下しなかつたことである。

【0079】

（実施例4）

（LITAC電場を使用する、單一方向多重ウェル調製用電気泳動による血液からのゲノムDNAの精製）

（核酸サンプル）

核酸を、先の実施例3に記載のように調製した。

【0080】

(電気泳動装置および条件)

電気泳動マトリクス、ウェルの形状および位置、ならびにゲルボックス装置は、先の実施例3に記載のとおりである。LITAC電場プロフィールを、すぐ以下に記載する。

【0081】

(電気泳動プロトコル)

16の核酸サンプル(約80ngのヒトゲノムDNAを各々含む、22μLの溶解および消化した血液)を、隣接するウェル内にロードした。13.2V/cmでのDC順方向電気泳動を一期間17分で行い、その時間の後、順方向の電場を、DC電場からLITAC電場に変化させた。LITACプロフィールは、40秒の継続時間および-6.9V/cmの電場の強さを有する順方向部分、ならびに20秒の継続時間および13.8V/cmの電場の強さを有する逆方向部分からなる。LITACレジームを、150分間の総時間で適用した。100μLの精製核酸サンプルを、LITAC電気泳動開始後10分間隔で、各々の回収ウェルから収集した。

【0082】

16の100μLの精製核酸サンプルを凍結乾燥し、そして21μLの水に再懸濁した。0、20、40、60、80、100、120、および140分のLITAC時間に対応するサンプルを、分析用電気泳動に供し、回収された精製核酸の量および大きさを決定した。この分析用電気泳動により、0および20分のLITAC時間で採取したサンプルは、EtBr染色させたゲル上で可視化されるに十分なヒトゲノムDNAを含まないこと、40分のLITAC時間で採取したサンプルは、わずかに可視的な量(約1ng)のヒトゲノムDNAを含むこと、ならびに60、80、100、120、および140分のLITAC時間で採取したサンプルは、約20ngのヒトゲノムDNAを各々含むことが示された。全ての精製DNA分子は、48.5kbより大きかった。

【0083】

ここで使用したL I T A C パルスは、先の実施例3に記載される方法に有意な改善を提供する。なぜなら、回収ウェルに到達するD N Aは、ウェルを通過して移動するよりも、むしろ回収ウェル中に捕捉されるからである。このことは、60、80、100、120、および140分のL I T A C 時間で採取したサンプル全てが、ほぼ同じ量のD N Aを含むという事実から証明される。精製核酸の收率は、依然相対的に低い（すなわち、本実施例において約25%）。なぜなら、ローディングウェルにロードされたD N Aの大部分（おそらく、50%まで）が、このウェルを全く離れないからである。これは、このD N Aが大きすぎるためにゲルに入らないという事実に起因するようである。

【0084】

(実施例5)

(L I T A C 逆方向電場を使用する、捕捉調製用電気泳動による血液からのゲノムD N Aの精製)

(核酸サンプル)

核酸サンプルを、実質的に先の実施例3に記載されるように調製した(10 μ lの新鮮血液を30 μ lの溶解緩衝液の代わりに60 μ Lの溶解緩衝液と混合し、そしてこの溶解緩衝液は250mMのN a C lの代わりに125mMのN a C lを含むことを除く)。

【0085】

(電気泳動装置および条件)

電気泳動マトリクスは、2.0%アガロースゲルであり、そしてP r o m e g aのM o l e c u l a r B i o l o g yグレードのアガロースで作製した。ゲルは、2.2×11.7cmであり、そしてゲルの中間に位置されるローディング／回収ウェルの单一セットを備えた。このウェルは、厚さ1mm、かつ幅5mmであった。ウェル形成コームと液体アガロースとの間の毛管作用に起因するウェル周辺に隆起するゲルを、カミソリの刃を使用して除去して、均一に平坦な表面を有するゲルを作製した。ゲルおよび泳動槽の両方の緩衝液は、0.2×T A Eであった。

【0086】

電気泳動を、長さ 27.2 cm かつ幅 12 cm の H5 ゲル電気泳動槽 (Gibco BRL, Life Technologies) 中で行った。ゲルを横切る電場、およびゲル泳動槽緩衝液の温度を、Model 2706 マルチメータ (BK Precision, Chicago, IL) を使用して測定した。870 mL の緩衝液を電気泳動槽に加えた。この緩衝液の量は、幅 5 mm の緩衝液の層の下にゲルを浸すのに十分である。

【0087】

(電気泳動プロトコル)

9つの核酸サンプル (約 80 ng のヒトゲノム DNA を各々含む、22 μL の溶解および消化した血液) を、隣接するウェル内にロードした。DC 順方向電気泳動 (10.5 V/cm で) を 18 分間行なった。次いで、10.5 V/cm の逆方向 DC 電場を 30 秒間適用した。次いで、2つの 22 μL サンプルを 3 つのウェルの 2 つ (サンプル #1 および #2) から収集した。次に、ゲルからの DNA の回収を改善するために、-10.5 V/cm で 15 秒、および 5.0 V/cm で 30 秒の LiTAC パルスを、12 分間適用した。次いで、7つの 22 μL サンプルを、他の 7 つのウェル (サンプル #3 ~ #9) から収集した。

【0088】

サンプル #1、#2、#3、および #9 を、分析用電気泳動に供し、精製核酸の量および大きさを決定した。この分析用ゲルにより、0 分の LiTAC 時間で採取した 2 つのサンプル (サンプル #1 および #2) は、12 分の LiTAC パルス後に収集したサンプル (サンプル #3 ~ #9) 中に含まれる DNA の約半分しか含まないことが示された。サンプル #3 および #9 に対応する EtBr DNA バンドの視覚的試験 (公知の量の λ-ファージ DNA と比較する) により、約 50 ng の DNA が、これら 2 つのサンプル中に回収されたことが示された。このことは、最初にロードしたヒトゲノム DNA の約 55 % の収率を示す。全ての精製 DNA 分子は、48.5 kb より大きかった。

【0089】

精製核酸の量を決定するために、精製核酸を鑄型として使用して PCR 増幅を行った。標準 PCR 条件を使用して PCR を行った。強い PCR 増幅産物 (約 4

00 bpのDNAフラグメント)を、本発明者らが未希釈の精製核酸を使用した場合、または本発明者らが1、2、3、4、または5倍に希釈した精製核酸を使用した場合に観察された。このことは、本発明者らの方法を使用して精製されたDNAは、両方とも任意の混入物を比較的含まないこと(なぜなら、PCR増幅が作用するために希釈が必要ではないため)、および精製核酸が比較的濃縮されていること(なぜなら、強いシグナルが、精製核酸を希釈した場合でさえ観察されたため)を示す。

【0090】

ここで達成された比較的高い回収率(50%近く)は、この方法がゲルに全く入らない大きいDNA分子の回収を可能にする1ウェルの方法であるという事実により説明され得る。

【0091】

(実施例6)

(水平乾式ゲルフォーマットを使用する、捕捉調製用電気泳動による血液からのゲノムDNAの精製)

(核酸サンプル)

核酸サンプルを、実質的に先の実施例3に記載されるように調製した(溶解緩衝液が250mMのNaClの代わりに125mMのNaClを含むことを除く)。

【0092】

(電気泳動装置および条件)

電気泳動マトリクスは、2.0%アガロースゲルであり、そしてFMC Corporationから販売されるSeakem Goldアガロースで作製した。ゲルは、2.0×2.0cmであり、そして厚さ0.6cmであった。ゲルは、そのゲルの中間に位置される3つのウェルの单一セットを備えた。このゲルの3つのウェルは、長さ1mm、幅3.8mm、そして深さ5mmであった。先に記載されたように、ウェル周辺に隆起するゲルを、カミソリの刃を使用して除去して、均一に平坦な表面を有するゲルを作製した。

【0093】

電気泳動槽を緩衝液で満たすことに代えて、2つの直方体の緩衝液飽和スポンジを使用して、電極とゲルとの間の電気的接触をもたらした。これらのスポンジを、ゲルの両側に位置し、そしてゲルおよび電極の両方に直接的に接触するよう配置した。このスポンジは、長さ5cm、幅2cm（すなわち、ゲル幅と同じ幅）、そして厚さ1cm（すなわち、ゲルより4mm高い）であった。それらは、CAROLINE Cosmetics (Montreal, Canada) から販売される化粧用スポンジを切って作製した。ゲルおよびスポンジの両方の緩衝液は、0.2×TAE (7.8の未調整pH) であった。

【0094】

電気泳動を、27.2×12cmのH5ゲル電気泳動槽 (Gibco BRL, Life Technologies) の中間部分で行った。スポンジおよびゲルに対して電極を適切に位置するために、電極を電気泳動槽の壁から取り外し、そしてクランプを使用してスポンジに接触するように配置した。ゲルを横切る電場を、Model 2706マルチメーター (BK Precision, Chicago, IL) を使用して測定した。

【0095】

(電気泳動プロトコル)

3つのDNAサンプル（約80ngのヒトゲノムDNAを各々含む、20μLの溶解および消化した血液）を、隣接するウェル内にロードした。DC電気泳動を、順方向で25分間行い、次いで、逆方向で40秒間DC電気泳動した。順方向および逆方向の両方の電気泳動で、95ボルトの電圧を適用した。電気泳動中、ゲルを横切る実際の電圧（スポンジを横切って低下する電圧を除いて）、7V/cmと8V/cmとの間で変化した。次いで、20μLの精製核酸サンプルを、各々3つのウェルから収集した（サンプル#1、#2、および#3）。

【0096】

サンプル#1を分析用電気泳動に供し、回収した精製核酸の量および大きさを決定した。サンプル#1に対応するEtBr-DNAバンドの視覚的試験（公知の量のλ-ファージDNAと比較する）により、約30ngのDNAが、このサンプル中に回収されたことが示された。このことは、最初にロードしたヒトゲノ

ムDNAの約38%の全収率を示す。これらの精製DNA分子は、48.5 kbより大きかった。

【0097】

上記に記載の電気泳動精製方法を使用して精製されたDNAの量を決定するために、PCR試験を行った。標準PCR条件を使用してPCRを行った。強い増幅産物(約400 bpのDNAフラグメント)は、本発明者らが、サンプル#2からの未希釈の精製DNAを使用した場合であろうと、または本発明者らがそのサンプルを1倍に希釈した場合であろうと観察された。

【0098】

(実施例7)

(垂直型乾式ゲルフォーマットを使用する、捕捉調製用電気泳動による血液からのゲノムDNAの精製)

(核酸サンプル)

溶解させた血液サンプル中に存在するイオンの量を減少するために、NaCl濃度を250 mMから125 mMに低下させたことを除いて、先の実施例3に上記されるように核酸サンプルを調製した。そのようなNaClの量の減少は、回収されるDNAの量を有意に減少しないが、より一貫した精製結果を導く傾向があるということが確認されている。

【0099】

(電気泳動装置および条件)

使用した電気泳動マトリクスは、2%アガロースゲルであり、そしてFMC Corporationから販売されるSeakem Goldアガロースで作製した。円筒形ゲルは、直径3.8 cmかつ高さ8 cmであった。このゲルを、3.8 cmの内径および4.5 cmの外径を有する高さ8 cmの透明の Plexiglas管内で形成した。このPlexiglas管はゲルトレイとして機能し、そして電気泳動中に取り除かれない。ローディング/回収ウェルを作製するために使用した「コーム」は、Plexiglasの平面部分に接着された12個の長さ2.5 cmのポリプロピレンロッドからなり、各々のロッドは5 mmの直径を有する。これら12個のロッドを、各々のロッドの中心間で9 mmの距離

をおいて、以下のパターンで配置した。

【0100】

【表1】

	X	X	
X	X	X	X
X	X	X	X
	X	X	

このコームで作製したウェルは、直径5 mmかつ深さ1.5 cmであり、そして互いに4 mmのゲルで引き離されていた。ゲル緩衝液は、0.2×TAEであった。

【0101】

電極の立体配座は、その円筒形のゲルの各末端の2つの白金線グリッドからなる。これらのグリッドは、プラスチックシートに（ゲルのウェルと同じ位置に）5 mmの直径の穴を開け、そしてこれらの穴の間に白金線を組み込むことにより作製した。ゲルを通る電場を、Model 2706マルチメーター（BK Precision, Chicago, IL）を使用して測定した。

【0102】

(電気泳動プロトコル)

100 μ LのDNAサンプルを、各々の4つの中心ウェルにロードした。電気泳動を、以下の3つの連続的なレジームを使用して行った：1) 46 Vで30秒の順方向電場、次いで46 Vで10秒の逆方向電場からなるパルスプログラムを有する第一のパルスフィールドレジーム（全10分間適用させる）；2) 28 Vで30秒の順方向電場、次いで46 Vで10秒の逆方向電場からなるパルスプログラムからなる第二のパルスフィールドレジーム（全160分間適用させる）；および3) 2分間適用する46 Vの逆方向電場を含む逆方向DCレジーム。電気泳動の終結で、電場を消し、そして70 μ Lのサンプルを4つの中心ウェルの1つから回収する。

【0103】

10 μLの回収した精製核酸を、分析用電気泳動に供し、その量および大きさを決定した。分析用ゲルにロードしたコントロールは、5、12.5、25および50 ngの未切断のλ-ファージDNA（長さ48.5 kb）を含むサンプルであった。分析用ゲルの視覚的検査により、精製核酸は、48.5 kbより大きく、そして本発明者らのサンプルは、約0.5 ng/μLのヒトゲノムDNAを含むことが示された。

【0104】

このサンプルに含まれるDNAの相対的な純度は、純粋なヒトDNA、溶解し、そしてプロテイナーゼK消化した（しかし精製していない）血液サンプルに存在するヒトDNA、および本発明者らの精製ヒトDNAサンプルの段階希釈により得られるPCRバンドの強度を視覚的に比較することによって推測する。これらのPCR反応を、D7S-550プライマー（Perkin Elmer）、Stock markers緩衝液（Perkin Elmer）、およびAmpliciTaq DNAポリメラーゼ（Perkin Elmer）を使用して行った。この実験により、未精製（しかし溶解して、そしてプロテイナーゼK消化したヒト血液）サンプルに存在する混入物の濃度が、精製核酸において少なくとも50分の1にまで減少することが示された。

【0105】

(実施例8)

(アガロース／ポリプロピレン複合型電気泳動マトリクスの調製および使用)

(核酸サンプル)

核酸サンプルを、実質的に先の実施例3に上記されるように調製した（60 μLの溶解緩衝液を使用したこと）。

【0106】

(複合型マトリクスの調製)

120ミクロンの孔の大きさを有する厚さ0.0625インチのポリプロピレンシートを、幅11cmかつ長さ2cmの小片に切断した。6ウェルの列を、小片の中央に作製した。各ウェルは、幅5mm、長さ1.5mmおよび深さ5mm

であった。従って、ウェルの底に約1.5 mmのプラスチック物質が存在する。1つのウェルの中心から、次のウェルの中心までの距離は、16 mmであった。

【0107】

プラスチック小片を、使用前に5分間70%エタノール中で浸漬した。0.2×TAE pH 7.9を含む100 mLの3%SeaKem Goldアガロースを、1分間煮沸し、そして5分間室温で冷却した。次いで、よく混合し、そして再度5分間煮沸した。次いで、この手順を3回繰り返し、そして滅菌水を添加して蒸発した水を補充した。これは、アガロース溶液が、均質になり、そしてよく溶解されることを保証した。70%エタノールで浸漬したプラスチック小片を、熱いアガロースの液体内に滴下し、よく振盪し、次いで、3分間マイクロ波中で煮沸した。

【0108】

熱い液体アガロースおよびプラスチック小片を、封着したゲルトレイ（長さ14 cm、幅11.2 cm、および深さ2 cm）に移し、そしてアガロースを約1時間室温に放置し凝固させた。プラスチック小片を、そのいずれかの端に2.5 cmのアガロースを有するようにゲルトレイの中央に配置した。アガロースが凝固したらすぐに、プラスチック小片を含むゲルをトレイから取り外し、そしてこのゲルを、幅11.2 cmおよび長さ7 cmのゲル片（すなわち、2.5 cmのアガロースゲル、2 cmのプラスチック小片、および別の2 cmのアガロースゲル）に切断した。ウェル中に存在するアガロースを、注射を使用して除去した。またプラスチック小片の上面および下面が、1 mmのアガロースの層で覆われていたことにも留意する。

【0109】

(電気泳動装置および条件)

電気泳動を、長さ27.2 cmかつ幅12 cmのH5ゲル電気泳動槽 (Gibco BRL, Life Technologies) 中で行った。870 mLの0.2×TAE pH 7.9の緩衝液を電気泳動槽に加えた。この緩衝液の量は、厚さ5 mmの緩衝液の領域がプラスチック小片を含むゲルを覆うのに十分であった。

【0110】

ゲル全体およびプラスチック小片を通る電場を、Model 2706マルチメーター(BK Precision, Chicago, IL)を使用して測定した。117ボルトの電場を適用した場合、ゲル全体を通る電場は6.6V/cmであり、そしてプラスチック小片を通る電場は、9V/cmであることが見出された。このことは、プラスチック小片のいずれかの端の純粋アガロース切片中より、プラスチック小片(アガロースを含む)中のほうが抵抗が高いことを示す。

【0111】

(電気泳動プロトコル)

25μLの250mM NaCl含有溶解血液を、各々の6ウェル内にロードした。プラスチック小片を通る9V/cmのDC順方向電場を、60分間適用した。28μLの精製DNAサンプルを各々の最初の3ウェル(サンプル1、2、および3)から収集した。次いで、-9V/cmのDC逆方向電場を1分間適用し、そして別の3つの28μLサンプルを、残りの3ウェル(サンプル4、5、および6)から収集した。ゲル全体をEtBr溶液中で染色した。プラスチック小片の蛍光バックグラウンドは、アガロースゲルのそれよりも高いこと、およびウェル内の蛍光バックグラウンド(プラスチック小片の内部である)は、プラスチック小片の本体中より高いことが見出された。

【0112】

20μLのサンプル1および4を、0.4%Seakem Goldアガロースゲルにロードした。これら2つのサンプルに対応するEtBr DNAバンドの視覚的試験(公知の量のλ-ファージDNAと比較する)により、約25ngのDNAバンドが、各々の20μLの収集したサンプル中に回収されたことが示された。これは、最初にロードしたヒトゲノムDNAの約35%の収率を示す(35% = ((25ng / 20μL) × 28μL) / (25μL × 4ng / μL))。

【0113】

全ての刊行物および特許出願は、各々個々の刊行物または特許出願が、特定に

および個々に示され、参照として援用されるのと同程度に本明細書に参照として援用される。

【0114】

少数の実施態様が、先に詳細に記載されただけであるが、生化学分野の当業者は、多くの改変が、好ましい実施態様においてその教示から離れることなく可能であることを明らかに理解する。そのような全ての改変は、特許請求の範囲内に包まれることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1A～1Eは、本発明の夾雜物希釈の実施態様の概略図を示す。

【図2】

図2A～2Dは、本発明の捕捉の実施態様の概略図を示す。

【図3】

図3A～3Cは、本発明のLITAC逆方向電場の実施態様の概略図を示す。

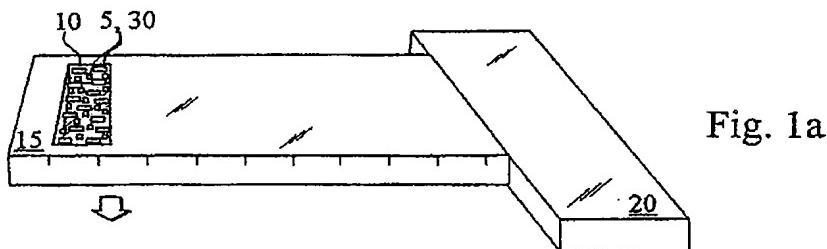
【図4】

図4A～4Dは、本発明の単一方向多重ウェルの実施態様の概略図を示す。

【図5】

図5A～5Dは、本発明の多重方向多重ウェルの実施態様の概略図を示す。

【図1a】



【図1b】

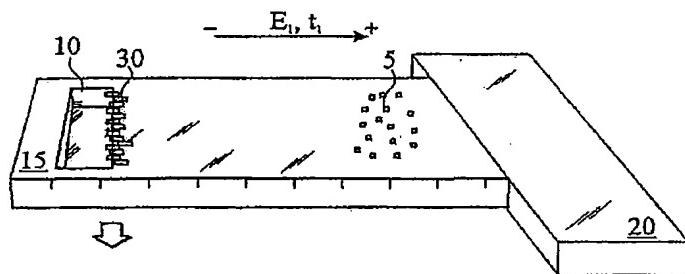


Fig. 1b

【図1c】

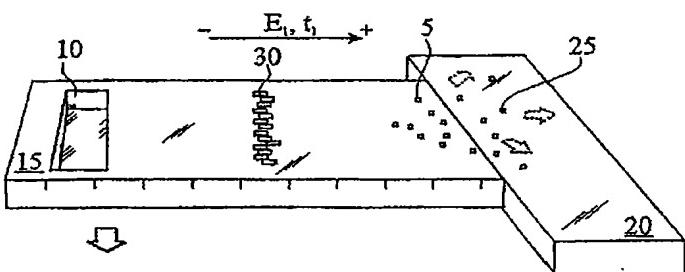


Fig. 1c

【図1d】

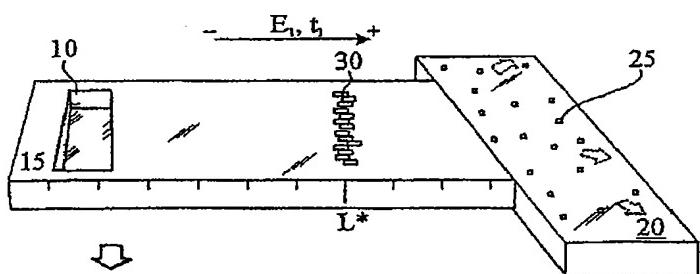


Fig. 1d

【図1e】

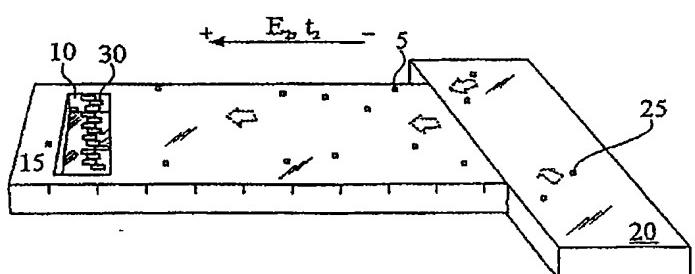
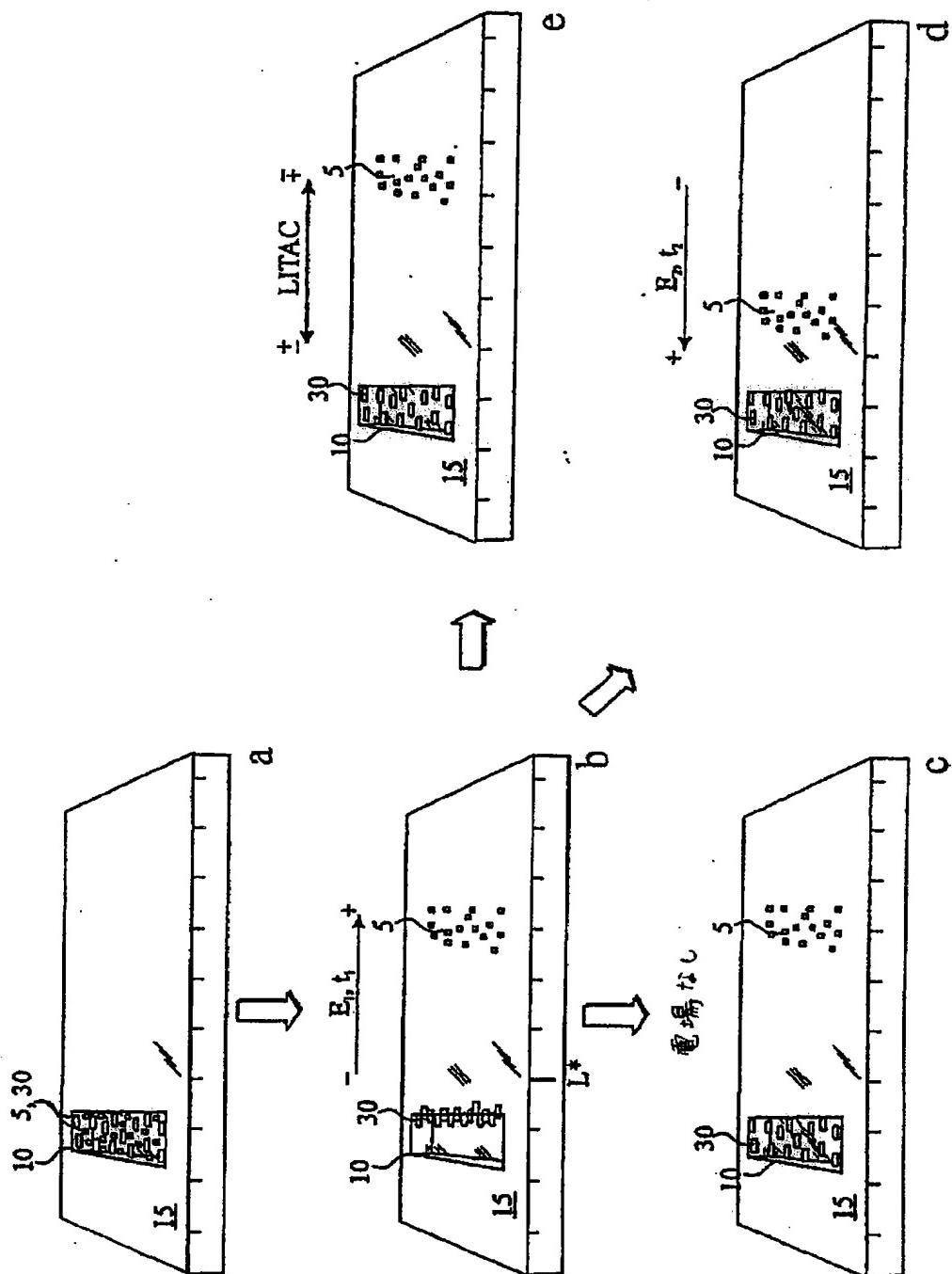


Fig. 1e

【図2】



【図3a】

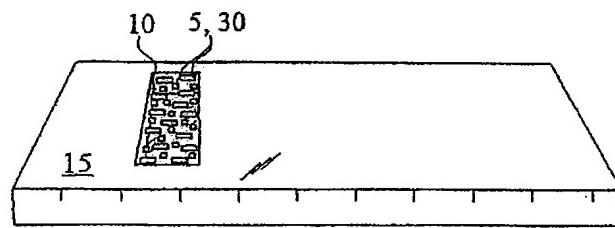


Fig. 3a

【図3b】

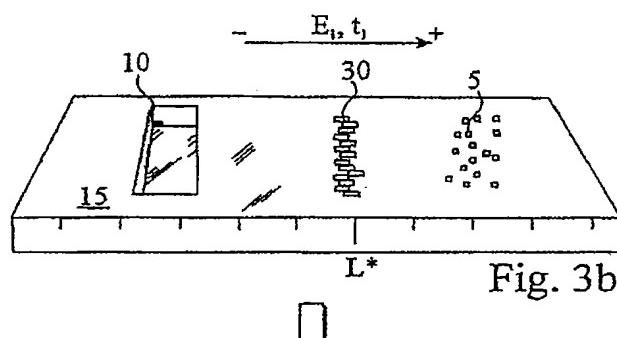


Fig. 3b

【図3c】

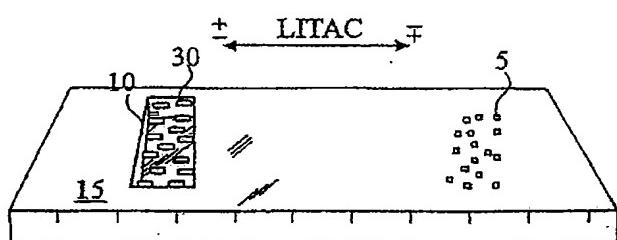


Fig. 3c

【図4a】

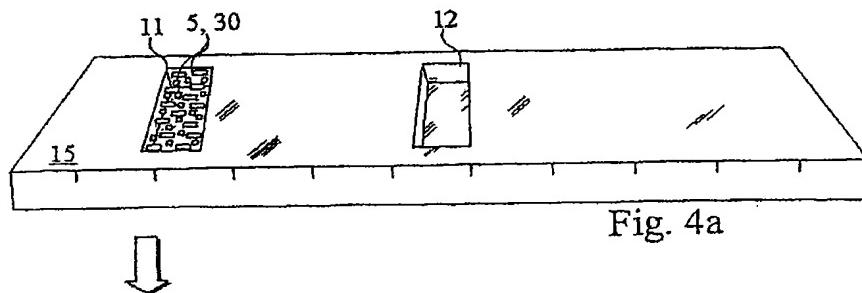


Fig. 4a

【図4 b】

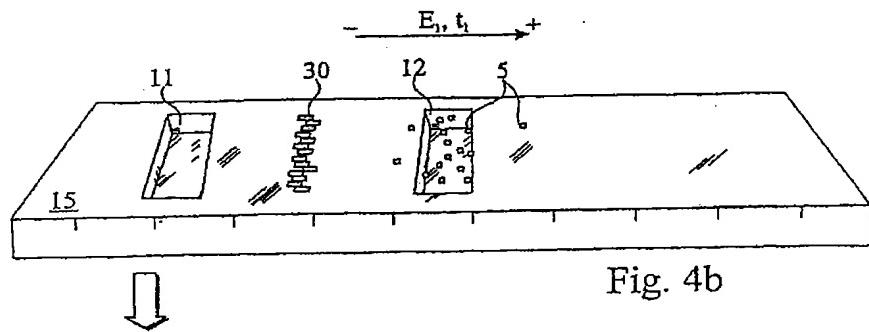


Fig. 4b

【図4 c】

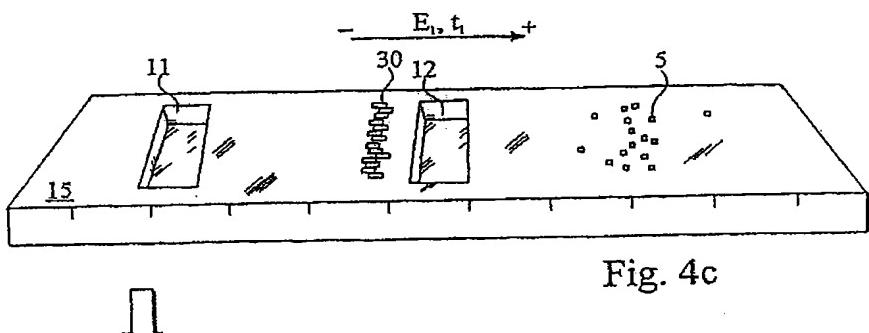


Fig. 4c

【図4 d】

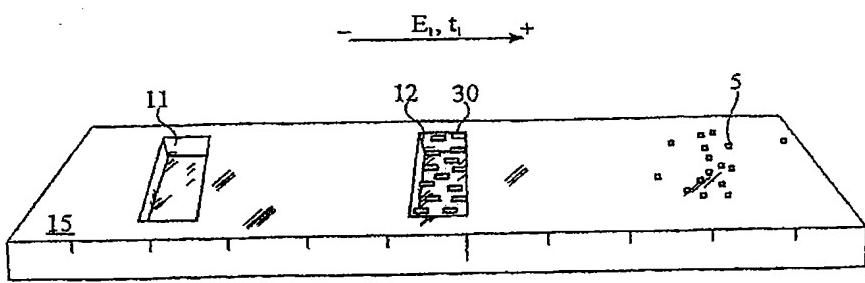


Fig. 4d

【図5a】

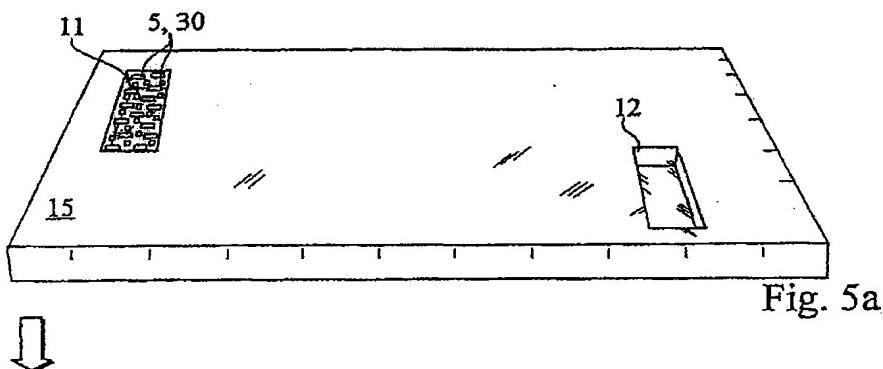


Fig. 5a

【図5b】

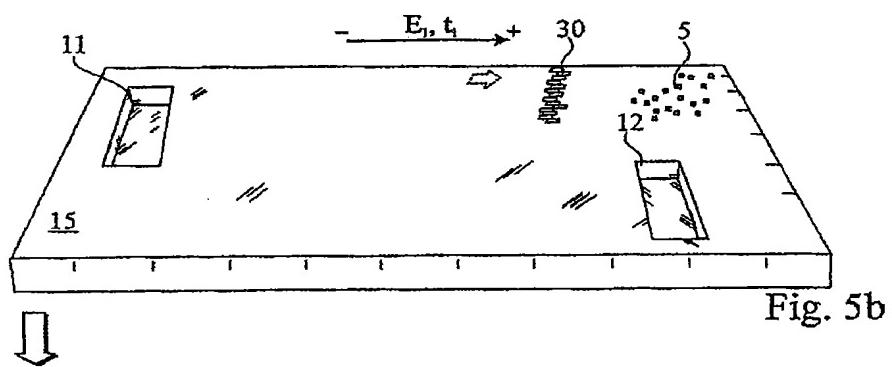


Fig. 5b

【図5c】

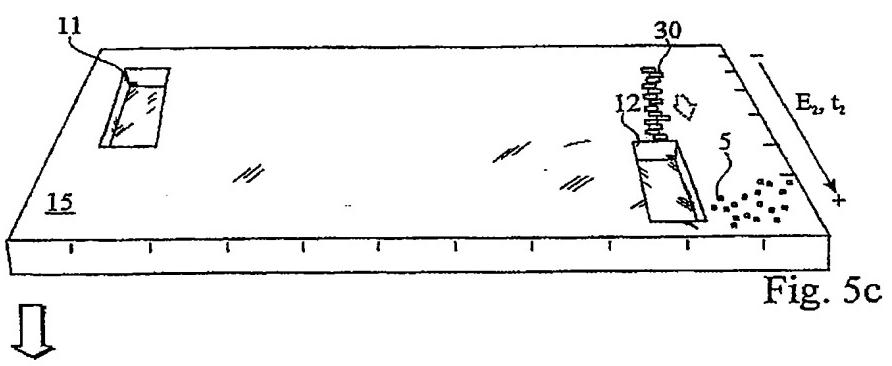


Fig. 5c

【図5d】

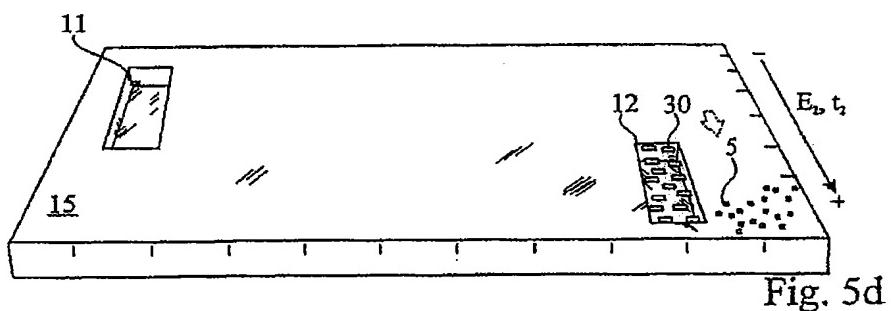


Fig. 5d

【国际調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Date of International Search Report PCT/US 99/01137																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07H/08 G01R27/447																				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC B. FIELDS SEARCHED Minimum document classification system followed by classification symbols IPC 6 C07H G01N																				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																				
Electronic data bases consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE IRRELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 95 14921 A (PERKIN ELMER CORP.; JOHNSON BEN F (US); MENCHEN STEVEN M (US); BLOC) 1 June 1995 (1995-06-01) claims 1,19</td> <td style="padding: 2px;">1,19</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 95 14922 A (PERKIN ELMER CORP) 1 June 1995 (1995-06-01) claims 1-40</td> <td style="padding: 2px;">1,19</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 86 04989 A (SCHUMACHER JUERGEN; RIESNER BETTEY) 13 February 1986 (1986-02-13) abstract</td> <td style="padding: 2px;">1,19</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">EP 0 773 225 A (PERKIN ELMER CORP) 14 May 1997 (1997-05-14) claims 6-13</td> <td style="padding: 2px;">1,19</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">—/—</td> <td style="padding: 2px;">—/—</td> </tr> </tbody> </table>			Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 95 14921 A (PERKIN ELMER CORP.; JOHNSON BEN F (US); MENCHEN STEVEN M (US); BLOC) 1 June 1995 (1995-06-01) claims 1,19	1,19	A	WO 95 14922 A (PERKIN ELMER CORP) 1 June 1995 (1995-06-01) claims 1-40	1,19	A	WO 86 04989 A (SCHUMACHER JUERGEN; RIESNER BETTEY) 13 February 1986 (1986-02-13) abstract	1,19	A	EP 0 773 225 A (PERKIN ELMER CORP) 14 May 1997 (1997-05-14) claims 6-13	1,19		—/—	—/—
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A	WO 95 14921 A (PERKIN ELMER CORP.; JOHNSON BEN F (US); MENCHEN STEVEN M (US); BLOC) 1 June 1995 (1995-06-01) claims 1,19	1,19																		
A	WO 95 14922 A (PERKIN ELMER CORP) 1 June 1995 (1995-06-01) claims 1-40	1,19																		
A	WO 86 04989 A (SCHUMACHER JUERGEN; RIESNER BETTEY) 13 February 1986 (1986-02-13) abstract	1,19																		
A	EP 0 773 225 A (PERKIN ELMER CORP) 14 May 1997 (1997-05-14) claims 6-13	1,19																		
	—/—	—/—																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of later C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex																		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the International filing date "L" document which may prove useful as priority evidence or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (see specification) "D" document relating to an application, name, withdrawn or other reasons "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the International search 27 July 1999		Date of mailing of the International search report 05/08/1999																		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1000, Postfach 30 2000-1030 Munich Tel. (089) 270-240-2010, Telex 31 551 090 DE Fax (089) 270-340-3916		Authorized officer Scott, J																		

Form PCT/ISA/210 second sheet (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Int'l Application No PCT/US 99/01137
Category	Character of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 545 689 A (UNIV NORTH CAROLINA) 9 June 1993 (1993-06-09) claims 1-11	1,19
A	EP 0 644 420 A (UNIV NORTH CAROLINA ; UNIV WAKE FOREST (US)) 22 March 1995 (1995-03-22) claims 1-27	1,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

- Information on patent family members

Inv. No. and Application No.
PCT/US 99/01137

Patent documents cited in search report	Publication date	Patent family members(s)		Publication date
WO 9514921 A	01-06-1995	AU 671562 B AU 1294695 A AU 8082794 A CA 2153175 A EP 0680605 A JP 2712058 B JP 8506424 T WO 9514922 A US 5891313 A	B A A A A B T A A	29-08-1995 13-06-1995 13-06-1995 01-06-1995 08-11-1995 10-02-1995 09-07-1995 01-06-1995 06-04-1995
WO 9614922 A	01-06-1995	AU 671562 B AU 1294695 A AU 8082794 A CA 2153175 A EP 0680605 A JP 2712058 B JP 8506424 T WO 9514921 A US 5891313 A	B A A A A B T A A	29-08-1995 13-06-1995 13-06-1995 01-06-1995 08-11-1995 10-02-1995 09-07-1995 01-06-1995 06-04-1995
WO 8600989 A	13-02-1986	DE 3428385 A AT 42000 T AU 4579835 A DD 236398 A EP 0190267 A	A T A A A	20-02-1986 15-04-1986 25-02-1986 04-06-1986 13-08-1986
EP 0773225 A	14-05-1997	US 5891313 A AU 7063195 A CA 2189381 A JP 9201200 A	A A A A	06-04-1995 19-06-1997 09-05-1997 05-08-1997
EP 0645689 A	09-06-1993	US 5178737 A CA 2082905 A,C JP 2098171 C JP 6011483 A JP 6011671 B	A A,C C A B	12-01-1993 05-06-1993 02-10-1993 21-01-1994 21-02-1995
EP 0644420 A	22-03-1995	US 5463162 A CA 2131597 A JP 7167837 A	A A A	26-09-1995 10-03-1995 04-07-1995

フロントページの続き

(51) Int.CI. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 12 N 15/09		C 12 N 15/00	A
(72)発明者	スレイター, ゲーリー カナダ国 ケイ1エス 2ワイ9 オンタ リオ, オタワ, ホーブウェル アベニ ュー 109		
(72)発明者	エフカピッチ, ジェイ, ウィリアム アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サン マテオ, イースト 16ティーエ イチ アベニュー ナンバーイエイ 418		
(72)発明者	ドロウイン, ガイ カナダ国 ジェイ8ブイ 2ピー5 ケベ ック, ガティニュー, ドゥ モントー ルカ 213		
(72)発明者	メイヤー, バスカル フランス国 エフ-01200 エロイズ, シャミン ド ネイ, 14		
(72)発明者	ルソー, ジーン カナダ国 ジー1アール 4エヌ3 ケベ ック, ケベック, ル ハルミマンド, 9, アパートメント 100		
(72)発明者	ゾウ, ホン ヤン カナダ国 ケー2シー 2ワイ5 オンタ リオ, オタワ, ハイゲート ロード 1337		
(72)発明者	チェサ, クラウディア アメリカ合衆国 カリフォルニア 94061, レッドウッド シティ, バーム アベ ニュー 1011		
(72)発明者	ルフェル, ロバート アメリカ合衆国 カリフォルニア 94117, サン フランシスコ, スコット スト リート 445, アパートメント エイ		
(72)発明者	オニール, ロジャー アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, メレンディ ドライ ブ 3180		